



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Odontología

Unidad de Posgrado

**Efecto antimicótico in vitro del orégano (*Origanum  
vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de  
la Estomatitis Sub Protésica**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Estomatología

**AUTOR**

Jorge Eleodoro VILLAVICENCIO GASTELÚ

**ASESOR**

Hilda MOROMI NAKATA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Villavicencio J. Efecto antimicótico in vitro del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología / Unidad de Posgrado; 2017.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

07/08/18

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO

ACTA N° 022-FO-UPG-2017

GRADO ACADÉMICO DE MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA

En la Ciudad de Lima, a diecinueve días del mes de junio del 2017, se reunió el Jurado Examinador de la Tesis titulada "Efecto antimicótico *in vitro* del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Prótesis", sustentado por el bachiller:

**JORGE ELEODORO VILLAVICENCIO GASTELÚ**

para obtener el Grado Académico de Magister en Estomatología; concluida la exposición, los miembros del Jurado Examinador formularon preguntas que fueron absueltas por el graduando y procedieron a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación:

EXCELENTE

Escala

19

Número

Diecinueve

Letras

En tal virtud, firmamos la presente Acta en cuatro originales y damos por concluido el Acto Académico de Sustentación.

  
Mg. SIXTO ÁNGEL GARCÍA LINARES  
Presidente

  
Dr. CARLOS ALBERTO SUÁREZ CANLLA  
Miembro

  
Mg. GILBERTO ALEJANDRO MENDOZA ROJAS  
Miembro

  
Mg. MARIETA PETKOVA GUEORGUIEVA DE RODRÍGUEZ  
Miembro

  
Mg. HILDA MOROMI NAKATA  
Miembro Asesora

Escala de calificación

- ❖ Excelente 20, 19
- ❖ Muy bueno 18, 17
- ❖ Bueno 16, 15
- ❖ Aprobado 14
- ❖ Desaprobado 13 o menos

**Efecto antimicótico *in vitro* del orégano (*Origanum vulgare*) en  
cepas de *Candida albicans* procedentes de la  
Estomatitis Sub Protésica**

**A Dios**

**Por permitirme ser instrumento de bien, por darme fortaleza, por iluminarme con sabiduría, por darme paciencia, por haberme guiado en la culminación de este estudio.**

**A la memoria de mis padres:**

**Eleodoro y María.**

**Con su infinita bondad siguen guiando mi camino.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Muy especial a mi esposa Lucila y mis hijos Erika y Johnny por la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos.

A la Mg. Hilda Moromi Nakata, por su asesoría, orientación, seguimiento, la invalorable motivación y apoyo recibido a lo largo del estudio.

A todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en el procesado seguimiento, realización y culminación del presente trabajo de investigación.

A todos, muchas gracias.

# ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	II
INTRODUCCIÓN.....	1
I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1. Situación problemática.....	2
1.2. Formulación del problema	
1.2.1. Problema general.....	3
1.2.2. Problemas específicos.....	4
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos	
1.4.1. Objetivo general.....	5
1.4.2. Objetivos específicos.....	6
II MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes de la investigación.....	7
2.2. Bases teóricas.....	15
III HIPÓTESIS	
3.1. Hipótesis general.....	27
3.2. Hipótesis específica.....	27
3.3. Identificación de variables.....	27
3.4. Operacionalización de variables.....	28
3.5. Matriz de consistencia.....	29
IV METODOLOGÍA	
4.1. Tipo y diseño de investigación.....	30
4.2. Unidad de análisis.....	30
4.3. Selección y obtención de la muestra.....	30
4.3.1. Criterios de inclusión.....	30
4.3.2. Criterios de exclusión.....	31
4.4. Técnica de recolección de datos.....	31
4.4.1. Prueba de hipótesis.....	40
V RESULTADOS.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	69



VII. CONCLUSIONES.....	71
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
IX. ANEXOS.....	82
9.1 Diagrama de flujo .....	82
9.2 Instrumento de recolección de datos .....	84
9.3 Constancias.....	85
9.4 Fotografías .....	87

## Indice de Tablas

Tabla 1. Operacionalización de variables .....	28
Tabla 2. Matriz de consistencia.....	29
Tabla 3. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) según concentración de Origanum x vulgare L (Tacna). ....	43
Tabla 4. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición (mm) según concentración de Origanum x intercedens (Chinito). ....	45
Tabla 5. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición (mm) según concentración de Origanum x majoricum (Nigra).....	46
Tabla 6. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición (mm) según concentración de Origanum x vulgare L (Jauja) .....	47
Tabla 7. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oréganos, concentración de 100%, sobre cepa aislada de Candida albicans .....	48
Tabla 8. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oréganos, concentración de 50%, sobre cepa aislada de Candida albicans .....	49
Tabla 9: Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oréganos, concentración de 25%, sobre cepa aislada de Candida albicans .....	50
Tabla 10. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oréganos, concentración de 12.5%, sobre cepa aislada de Candida albicans .....	51
Tabla 11. Comparación del halo de inhibición (mm) según concentración de Origanum x vulgare L (Tacna) con Clorexidina y Miconazol.....	52
Tabla 12. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de Origanum x intercedens (chinito) con Clorhexidina y Miconazol .....	53

Tabla 13. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x majoricum</i> (Nigra) con Clorhexidina y Miconazol.....	54
Tabla 14. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x vulgare</i> L (Jauja) con Clorhexidina y Miconazol .....	55
Tabla 15. Actividad antimicótica de los aceites esenciales estudiados frente a <i>Candida albicans</i> y control positivo (C+) Miconazol y Clorhexidina (Halos de inhibición expresada en mm). .....	56
Tabla 16. Composición química aceite esencial <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) “AEACH1” .....	57
Tabla 17. Composición química aceite esencial <i>Origanum x majoricum</i> , (nigra) “AEANE-2” .....	59
Tabla 18: Composición química aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> L (Tacna) “AETA-3” .....	60
Tabla 19: Composición química aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja) “AEJA-4” .....	61
Tabla 20. Resumen comparativo: Composición química de AEO <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) (AEACH1), <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (AEANE-2), <i>Origanum vulgare</i> L (Tacna) (AETA-3), <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja) (AEJA-4). .....	63
Tabla 21. Principales quimiotipos de Orégano.....	64
Tabla 22. Rendimiento de aceite esencial de orégano .....	65
Tabla 23. Relación entre la acción inhibidora del timol / carvacrol.....	66

## Índice de Figuras

Figura 1. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x vulgare</i> L (Tacna) .....	44
Figura 2. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x intercedens</i> (Chinito) .....	45
Figura 3. Comparación del halo de inhibición (mm) según concentración de <i>Origanum x majoricum</i> (Nigra).....	46
Figura 4. Comparación del halo de inhibición (mm), segun concentración de <i>Origanum x vulgare</i> L (Jauja).....	47
Figura 5. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 100%, sobre cepa aislada de <i>Candida albicans</i> .....	48
Figura 6. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 50%, sobre cepa aislada de <i>Candida albicans</i> .....	49
Figura 7. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 25%, sobre cepa aislada de <i>Candida albicans</i> .....	50
Figura 8. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 12.5%, sobre cepa aislada de <i>Candida albicans</i> .....	51
Figura 9. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x vulgare</i> L (Tacna) con Clorexidina y Miconazol.....	52
Figura 10. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) con Clorhexidina y Miconazol .....	53
Figura 11. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x majoricum</i> (Nigra) con Clorhexidina y Miconazol.....	54
Figura 12. Comparación del halo de inhibición (mm) segun concentración de <i>Origanum x vulgare</i> L (Jauja) con Clorexidina y Miconazol.....	55

Figura 13. Cromatograma de gases de aceite esencial <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) (AEACH1) .....	58
Figura 14. Cromatograma de gases de aceite esencial <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (AEANE-2) .....	58
Figura 15. Cromatograma de gases de aceite esencial <i>Origanum vulgare L</i> (Tacna) (AETA-3) .....	61
Figura 16. Cromatograma de gases de aceite esencial <i>Origanum vulgare L</i> (Jauja) (AEJA-4).....	61
Figura 17. Diagrama de dispersión y coeficiente de determinación entre halo / timol .....	67
Figura 18. Diagrama de dispersión y coeficiente de determinación entre halo / carvacrol.....	68

## RESUMEN

**Introducción:** La Estomatitis Sub Protésica (ESP) es una alteración inflamatoria crónica de la mucosa oral, producida por la acción de la base acrílica de una prótesis dental mal adaptada, mala higiene y presencia de microorganismos principalmente *Candida albicans*. **Objetivo:** el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica (ESP); como alternativo farmacológico para la prevención y tratamiento de la ESP. **Metodología:** Se efectuó la recolección de cuatro variedades de orégano: *Origanum x intercedens* (chinito), *Origanum x majoricum* (nigra), *Origanum vulgare* L (Jauja) y *Origanum vulgare* L (Tacna). Se obtuvo los aceites esenciales mediante proceso de destilación por arrastre con vapor de agua. La composición química se determinó cuantitativamente por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM). Los principales componentes químicos encontrados fueron: sabineno (3,67%); p-cimeno (3,52%);  $\alpha$ -terpineno (4,90%);  $\gamma$ -terpineno (9,04%); cis- $\beta$ -terpineol (3,62%); 4-terpineol (11,56%); 1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno (4,06%); acetato de linalol 8,58; timol (14,71%); carvacrol (0,88%);  $\gamma$ -elemeno (4,76%) y elixeno (3,58%). Se comprobó *in vitro* el efecto antimicótico de los aceites esenciales a través de pruebas de sensibilidad con el método de difusión en cultivo de agar frente a *C. albicans* y se comparó con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%). **Resultados:** Los aceites esenciales de orégano de las cuatro especies estudiadas mostraron efecto antimicótico, en diferentes concentraciones, y mostraron diferencias significativas frente al Miconazol y Clorhexidina. Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare* puede ser una alternativa farmacológica para el tratamiento de la Estomatitis Sub Protésica.

**Palabras clave:** *Origanum vulgare*, antimicótico, *Candida albicans*, micosis, Estomatitis Subprotética, Miconazol, Clorhexidina.

## SUMMARY

**Introduction:** Denture Stomatitis is a chronic inflammation of the oral mucous membrane, generated by the usage of a wrongly fitting acrylic denture, poor dental hygiene and presence of microorganism, mainly *Candida albicans*.

**Objective:** the present study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal effect of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) in *Candida albicans* strains from Denture Stomatitis (DS); as a pharmacological alternative for the DS prevention and treatment. **Methodology:** Four oregano varieties were collected: *Origanum x intercedens* (chinito), *Origanum x majoricum* (nigra), *Origanum vulgare* L (Jauja) and *Origanum vulgare* L (Tacna). Essential oils were obtained by steam distillation process. The chemical composition was quantitatively determined by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). The following chemical compounds were found: sabinene (3,67%); p-cymene (3,52%);  $\alpha$ -terpinene (4,90%);  $\gamma$ -terpinene (9,04%); cis- $\beta$ -terpineol (3,62%); 4-terpineol (11,56%); 1-methoxy-4-methyl-2-(1-metietil)-benzene (4,06%); linalool acetate (8,58%); (8,58%); thymol (14,71%); carvacrol (0,88%);  $\gamma$ -elemene (4,76); elixeno (3,58%). The antifungal effect of the essential oils was tested *in vitro* through sensitivity tests with the agar diffusion method against *C. albicans* and compared with Miconazole (oral gel 20 mg/g) and Chlorhexidine mouthwash (0,12%). **Results:** *Origanum* essential oils of the four varieties showed a high antifungal effects in several concentrations with significant differences compared to Miconazole and Chlorhexidine. Therefore, it is concluded that the essential oil of *Origanum vulgare* can be a pharmacological alternative for the treatment of Denture Stomatitis.

**Key words:** *Origanum vulgare*, antifungal, *Candida albicans*, Denture Stomatitis, mycosis, Miconazole, Chlorhexidine.

## INTRODUCCIÓN

La Estomatitis Sub Protésica (ESP) es una patología de la mucosa bucal<sup>1, 2</sup>. Afecta a individuos portadores de prótesis removible y su prevalencia es alta, especialmente en pacientes entre 45 a 65 años, incrementándose con la edad<sup>3</sup>.<sup>4</sup>. Se caracteriza por presentar un proceso inflamatorio crónico con lesiones eritematosas, brillantes e hiperplásicas y eventualmente hemorrágicas. Se desarrolla mayormente en la mucosa de paladar duro, reborde alveolar de maxilares y mandíbula, causadas principalmente por la interacción de la mucosa, la presencia de microorganismos y la prótesis dental removible<sup>4-6</sup>. Los factores desencadenantes más importantes de ESP son la mala higiene bucal y la presencia de candida, que se desarrollan simbióticamente con *Streptococo mutans*<sup>7, 8</sup>. Estas dos especies son parte de la microflora normal de mucosas. Sin embargo, cuando se altera el equilibrio inmunológico del individuo, éstas se transforman en patógenos oportunistas. El más importante es la *Candida albicans*, debido a su alta capacidad de adherencia a la superficie de la mucosa y prótesis dental, que originan el proceso inflamatorio<sup>9</sup>. En el tratamiento de la ESP se considera el prudencial reemplazo de la prótesis dental y uso de antimicóticos alternativos, siendo la actual tendencia el uso de agentes fitoterapéuticos con mayores márgenes terapéuticos, debido a su menor resistencia y efectos secundarios que los productos sintéticos. Las plantas aromáticas como el *Origanum vulgare* tienen aceites esenciales que contienen sustancias bioactivas con alto potencial farmacológico de actividad antimicrobiana y antimicótica. Su composición química es variada y depende del quimiotipo y geotipo de la planta. El *Origanum vulgare* contienen terpenos y derivados fenólicos, entre los que se destaca el timol y carvacrol, en concentraciones diferentes<sup>10, 11</sup>.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de cuatro especies de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de Estomatitis Sub Protésica<sup>12-15</sup>.



## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Situación problemática

Gran parte de la población de países en vías de desarrollo pierden gradualmente la dentadura. En algunos poblados del Perú existe entre 45% y 55% de edentulismo en los maxilares superior y/o inferior, del cual aproximadamente en el 50% de casos se debe al uso de al menos una prótesis dental, que predispone la aparición de lesiones en el área de soporte protésico denominado “Estomatitis Sub Protésica”<sup>11, 16, 17</sup>. Esta patología presenta alta prevalencia y se observa con mayor frecuencia en pacientes entre la quinta y sexta década de vida, incrementándose a medida que aumenta la edad. Esta problemática genera gran preocupación en los profesionales de la salud bucal, quienes demuestran cada vez más interés en la prevención y tratamiento<sup>5, 18, 19</sup>.

La ESP es una lesión inflamatoria congestiva de la mucosa oral que aparece al contacto con una base protésica. Comienza con algunos puntos de congestión en la mucosa, que se va extendiendo hasta alcanzar toda la zona de tejido cubierta por la prótesis. Entre los principales factores de riesgo que influyen en el inicio y progresión de ESP se considera: el deficiente hábito de higiene bucal y de la prótesis dental, el uso continuo de la prótesis dental incluso durante la noche, el tiempo de fabricación, la desadaptación con trauma ocasionado por el mal ajuste, irregularidades en la superficie de la base protésica; así como también infecciones causadas por microorganismos oportunistas, como la *Candida albicans*<sup>3, 5, 9, 18, 19</sup> y otros factores predisponentes como: xerostomía, antibióticoterapia prolongada, alergia al acrílico de la base protésica, enfermedades sistémicas (anemia, diabetes mellitus, leucemia, VIH) entre otros<sup>3, 20</sup>.

La candida forma parte de la microflora normal que coloniza la superficie mucosa de la cavidad oral, del tracto digestivo y la vagina en el huésped humano sano. Sin embargo, cuando se altera el equilibrio inmunológico,

se altera el comportamiento de la microflora normal, transformándose en patógeno oportunista, siendo la *Candida albicans* la especie aislada con mayor frecuencia. Ésta, a su vez, es considerada como un principal factor del desencadenamiento de la ESP en sus diferentes niveles<sup>9, 18</sup>, debido a que es la única especie que posee una propiedad adherente y le permite instalarse en la superficie de la prótesis dental y en la superficie de la placa microbiana, que facilita su multiplicación y genera un proceso inflamatorio en el tejido blando subyacente a la prótesis<sup>3, 9, 21-23</sup>.

En el tratamiento de la ESP se contempla principalmente el control de la prótesis dental y el uso terapéutico de drogas antimicóticas como los antibióticos poliénicos: Nistatina y Anfotericina tópica, que actúan contra hongos y levaduras; los imidazoles: Ketoconazol y Miconazol tópico y los triazoles: Itraconazol y Fluconazol, componentes activos contra *Aspergillus* y *Candida albicans*<sup>24, 25</sup>.

Actualmente existe una fuerte tendencia a la búsqueda de nuevos agentes fitoterapéuticos alternativos, denominados en el Perú como “Producto natural de uso en salud”<sup>26</sup>. Éstos suelen tener mayores márgenes terapéuticos y rara vez desarrollan resistencia. Tienen menos efectos secundarios que los fármacos sintéticos y se encuentran en las plantas aromáticas, como el Aceite Esencial de Orégano (AEO), con variedad de sustancias bioactivas de alto potencial farmacológico, que han sido empleadas de manera tradicional para tratar procesos inflamatorios, enfermedades micóticas, bacterianas, parasitarias y virales<sup>19, 27</sup>.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuál es el efecto antimicótico *in vitro* del Aceite Esencial de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto antimicótico *in vitro* de los aceites esenciales en concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100% de *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) sobre cepas de *Candida albicans*, procedente de pacientes con Estomatitis Sub Protésica?
- ¿Cuál es la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) comparado con el Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas de *Candida albicans* procedente de la Estomatitis Sub Protésica?

### 1.3. Justificación

El uso de prótesis dental constituye para la mucosa oral una agresión mecánica no fisiológica. Los efectos de presión, tracción y empuje producen estímulos irritantes que actúan como agentes nocivos que rompen el equilibrio tisular y generan un proceso de inflamación crónica del tejido de soporte protésico, produciendo lesiones que favorecen la formación de un medio ácido anaerobio que facilita la proliferación oportunista de *Candida albicans*, principal responsable del desencadenamiento de la ESP. Ésta, por su alta prevalencia, compromete funciones importantes como la masticación, deglución, fonación y además provoca secuelas de reabsorción ósea de la zona de soporte protésico. Como consecuencia, la calidad de vida del paciente se ve afectada de modo general<sup>28</sup>.

El aumento de infecciones oportunistas en la ESP, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, debido a la aparición de algunas cepas

de microorganismos resistentes a los antimicrobianos y antimicóticos de uso común, ha generado el mayor interés de investigaciones enfocadas a los agentes fitoterapéuticos, debido a las mínimas reacciones farmacológicas que presenta, teniendo éstos, incluso mayor potencial farmacológico que los productos de origen sintético<sup>21</sup>.

El *Origanum vulgare* es una planta aromática que contiene aceites esenciales, cuyos metabolitos secundarios como carvacrol y timol, tienen altos niveles de actividad antimicrobiana y antimicótica<sup>10, 11</sup>. La composición química y propiedades farmacológicas del *Origanum vulgare* puede variar debido a factores como el quimiotipo y geotipo de la planta, y por esta razón es necesario su detallado estudio para una correcta aplicación terapéutica<sup>21</sup>.

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans* de la ESP, a través de pruebas de sensibilidad en concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100% de dilución, para determinar su potencialidad farmacológica, comparado con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), que permitirá implementar pautas terapéuticas alternativas que contribuyan en la selección correcta del antimicótico más adecuado para el tratamiento de la Estomatitis Sub Protésica.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto antimicótico *in vitro* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L, (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) sobre cepas de *Candida albicans*.
- Comparar el efecto antimicótico *in vitro* de los aceites esenciales *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) en concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%.
- Comparar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L, (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa), con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas de *Candida albicans* procedente de la Estomatitis Sub Protésica.
- Determinar el quimiotipo del *Origanum vulgare* L, (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) de acuerdo a su geotipo.

## II MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

**Expósito J. et al. (2010)**<sup>3</sup>. Estudiaron 124 pacientes con diagnóstico de Estomatitis Subprótesis, observando que los factores de riesgos más frecuentes fueron: mala higiene bucal en 82% de los pacientes, deficiente higiene de la prótesis 87,5% y el uso nocturno continuo de la prótesis incidió en 88,2%; se reportaron las prótesis desajustadas en 71% de los pacientes. Entre los factores que fueron detectados con menos frecuencia se encontraron el hábito de fumar 47%, alergias 18,5%, consumo de alimentos calientes 7,2% y el factor que menos incidió en la muestra fue la diabetes mellitus 5,6%.

**Arcila-Lozano C. et al. (2004)**<sup>29</sup>. Estudiaron diferentes especies de orégano nativos de Europa y México, consideran que la composición química depende de la especie, clima, altitud, época de recolección y estado de crecimiento. Menciona entre sus propiedades: capacidad antioxidante, antimicrobiana contra microorganismos patógenos y antifúngico principalmente *Candida albicans*. En la composición química, han identificado: flavonoides, alcoholes alifáticos, derivados del fenilpropano y compuestos terpénicos; los principales quimiotipos son el carvacrol y timol, logrando identificar de 16 a 56 compuestos con diferencias cuantitativamente significativas, los que varían de acuerdo al quimiotipo. También encontraron que los rendimientos de extracción por el método de destilación con arrastre de vapor van desde el 1,8% al 5,6%. Mencionan que el timol y carvacrol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo. Los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0,28-1,7 mg/mL para bacterias, y de 0,65-1,27 mg/mL para hongos. La *Listeria multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de timol y sus derivados contienen alto porcentaje de p-

cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y el timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana.

**Tampieri M. P. et al. (2005)**<sup>10</sup>. Realizaron el estudio de la eficacia de dieciséis aceites esenciales, evaluando la actividad inhibidora *in vitro* de algunos aceites esenciales y sus principales constituyentes frente a una cepa de *Candida albicans*. Utilizaron el método de susceptibilidad antifúngica en agar semisólido (SAAS) y realizaron el análisis de cromatografía de gases / espectroscopía de masas de los aceites ensayados. Los aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Mentha piperita*, *Cinnamomum verum*, *Cymbopogon flexuosus* mostraron Actividad Inhibitoria Máxima (CMI = 500 ppm) después de 7 días; de acuerdo con los resultados del examen de los componentes puros. El  $\beta$ -felandreno demostró ser el componente más interesante entre los hidrocarburos cíclicos monoterpénicos, ya que mostró una fuerte actividad (CMI = 50  $\mu\text{g/mL}$ ). El más activo de los fenoles fue carvacrol (CMI = 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Da Silva F. C. et al. (2009)**<sup>11</sup>. Estudiaron la actividad antimicótica de una tintura comercial e infusión preparada con hojas deshidratadas de *Origanum vulgare* frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC 36802). Para la evaluación de la máxima dilución inhibitoria (MDI) utilizó diluciones al 50%, 25%, 12,5%, 6%, 3%, 1,5%, 0,75% y 0,3% de tintura e infusión. En un medio de cultivo se infectaron con 0,1 mL de las suspensiones de microorganismos estandarizadas por espectrofotometría. Los cultivos fueron incubados a 37°C por 24 horas. Los resultados mostraron crecimiento en los medios de cultivo a partir de la dilución al 50% de tintura e infusión de *Origanum vulgare*; concluyendo que las concentraciones de tintura e infusión de *Origanum vulgare* no demuestran acción inhibitoria sobre los microorganismos.

**Pozzatti P. et al. (2008)**<sup>30</sup>. Estudiaron la actividad antimicótica de aceites esenciales obtenidos de plantas usadas como especias, que fueron sometidos contra *Candida (spp)*, fluconazol-resistentes y fluconazol-

sensibles. Las especies estudiadas fueron: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, y *Candida krusei*. Para comparar fueron agrupados la *C. albicans*, *C. dubliniensis*, y *Candida no-albicans*. Los aceites esenciales fueron obtenidos de: *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), *Lippia graveolens* HBK (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Salvia officinalis* L. (salvia), *Thymus vulgaris* L. (tomillo), y *Zingiber officinale* (jengibre). Las pruebas de susceptibilidad fueron basadas en la metodología M27-A2. La composición química de los aceites esenciales fue obtenida por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (GS/MS) y por Retención de Índice. Los resultados mostraron que el aceite esencial de canela, orégano mexicano, orégano vulgar, tomillo y jengibre tienen diferentes niveles de actividad antimicótica. El *Origanum vulgare* L es el más eficiente en comparación con el jengibre. El principal hallazgo del estudio fue la susceptibilidad de los fluconazol-resistentes *C. albicans*, *C. dubliniensis*, y *Candida no-albicans* a los aceites esenciales de orégano mexicano, orégano vulgar, tomillo y jengibre que fueron superiores al de las levaduras fluconazol-susceptible ( $P < 0.05$ ). En contraste los fluconazol-resistentes *Candida albicans* y *Candida no-albicans* fueron menos susceptibles al aceite esencial de canela que sus contrapartes fluconazol-susceptible ( $P < 0.05$ ). Los otros aceites no mostraron actividad antimicótica. Se observó una relación entre las susceptibilidades de las levaduras y la composición química de los aceites esenciales estudiados.

**Cleff et al. (2010)<sup>13</sup>.** Evaluaron la composición química y la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) contra dieciséis especies de *Candida*. El aceite esencial fue extraído por el procedimiento de hidrodestilación y analizado por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (GS/MS). Se identificó entre los principales componentes: 4-terpineol (47,95%), carvacrol (9,42%), timol (8,42%) y  $\alpha$ -terpineol (7,57%). La actividad antimicótica del *Origanum vulgare* (orégano) fue evaluada por el método de microdilución de caldo sobre *Candida*, entre ellas: *C. albicans* (ATCC strains 44858, 4053, 18804



y 3691), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 34135), *C. lusitanae* (ATCC 34449) y *C. dubliniensis* (ATCC MY646). La susceptibilidad fue expresada como la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) y la Concentración Bactericida Mínima (MBC), estas fueron: 2,97 µl/mL y 3,4 µl/mL respectivamente. Concluyeron que todas las especies de *Candida* aisladas y evaluadas *in vitro* fueron sensible al aceite esencial; sugiriendo que el aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) sobre las especies de *Candida* observadas *in vitro* podría ser una alternativa para el tratamiento de la candidiasis.

**Souza N. et al. (2010)**<sup>14</sup>. Estudiaron la eficacia de los aceites esenciales del *O.vulgare L.* y *O. majorana L.*, en la inhibición del crecimiento y supervivencia de hongos potencialmente patógenos. Evaluaron los posibles mecanismos en relación a las propiedades antimicóticas determinadas a través de pruebas de estabilidad osmótica y morfogénesis. Las especies estudiadas fueron: *Candida albicans* ATCC 7645, *C. tropicalis* LM-14, *C. krusei* LM-09, *Cryptococcus neoformans* FGF-5, *Aspergillus flavus* LM-02, *A. fumigatus* IPP-21, *T. Rubrum* ATCC 28184, *T. Mentagrophytes* LM-64, *Microsporum gypseum* ATCC 184, *M. Canis* LM-36 y *Cladosporium herbarium* ATCC 26362. Para la *Candida albicans* ATCC 764, la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) con el *O. vulgare L.* y *O. majorana L.*, fue de 80 y 160 µL/mL respectivamente. Concluyen que el aceite esencial de orégano puede ser un potencial antimicótico para controlar el crecimiento de hongos y evitar alteraciones micóticas.

**Campos FC. et al. (2011)**<sup>31</sup>. Analizaron la aplicación de clorhexidina contra las especies de *Candida* y la gingivitis en 26 niños con el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) del Hospital Pediátrico de la Universidad de Rio de Janeiro, así como su aceptación al tratamiento. Se realizó un examen previo de Placa Bacteriana (biofilms), índices Gingivales y Saliva Estimulada, para determinar la condición de la gíngiva, por estudio del grupo de bacterias y especies de *Candida*. El procedimiento consistió en la administración del gel de clorhexidina (0.2%) mediante el cepillado de

dientes por 21 días, luego del cese del mismo por 35 días; los resultados obtenidos fueron que todos los niños dieron positivo para candida y gingivitis, después de la aplicación de 21 días, el conteo de candida y presencia de gingivitis se redujo en 25 y 26 niños respectivamente; la reducción promedio fue aproximadamente 68% para las especies de Candida y 74% para la gingivitis. Después de 35 días sin usar el gel la gingivitis y la candidiasis se incrementó en 13 y 16 niños respectivamente. Dentro de las especies de Candida, la *Candida albicans* fue la que se presentó con mayor frecuencia. La mayoría de los niños (85 %) no tuvieron problemas con el uso del gel de clorhexidina. Concluye que la terapia con clorhexidina es una opción para el tratamiento y prevención de la gingivitis, y reducción del conteo de levaduras en niños afectados con VIH.

**Adams A. et al. (2011)**<sup>12</sup>. Realizaron estudio *in vitro* de las propiedades antimicóticas de aceite esencial de *Origanum vulgare* contra las levaduras *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, el AEO fue obtenido por hidrodestilación. Las levaduras inicialmente fueron cultivadas a 37°C por tres días y luego transferidas a temperatura ambiente (25°C), éstos se subcultivaron rutinariamente. Todas las especies de levadura fueron mantenidas en Agar Saburo Dextrosa (DIFCO) y luego cultivadas en Extracto-Peptona-Dextrosa (YPD) (medio ATCC 1245) para la prueba de inhibición de crecimiento en medio líquido y sólido.

Prepararon grupos con 5 mL de medio de cultivo, que contenía 4,5 mL de caldo YPD y 0,5 mL de pre cultivos de levadura, 5 y 10 µL de aceite esencial de orégano correspondientes a las concentraciones de 200 y 400 µg/mL, respectivamente; los tubos de ensayo se incubaron a 37°C en un agitador rotatorio. Las mediciones de crecimiento lo realizaron durante una semana midiendo la densidad óptica con Espectrofotómetro a 600 nm. Se mantuvo grupos de control en blanco con 200 µg/mL etanol y 400 µg/ mL de AEO en 5 mL de caldo YPD.

Evaluaron la susceptibilidad de *C. albicans* y *C. neoformans* para AEO mediante la prueba de inhibición del crecimiento en medio sólido empleando el método de difusión en disco, Alícuota 100 µL a partir de 10 mg/L de AEO en etanol (equivalente a 1000 µg de AEO) añadido gota a gota en un disco estéril de 7mm. Se mantuvo un control añadiendo 90% de etanol a cada disco estéril. 1 mL de suspensión de cepas de levadura se extendieron en Agar Saburo Dextrosa (DIFCO) con estándares de 0,5 McFarland, fueron incubadas durante 7 días a 37°C.

Los resultados de esta investigación muestran una diferencia en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. albicans* en ambas concentraciones (200 y 400 µg/mL) a 40 hs de incubación. En otros intervalos de tiempo el porcentaje de inhibición de crecimiento de la cepa de levadura en 400 µg/mL de AEO fue relativamente mayor en comparación con cultivadas a 200 µg/mL de AEO. El efecto inhibitor de AEO sobre el crecimiento de esta cepa de levadura fue corroborado por el método de difusión de disco.

Menciona que anteriores estudios encontraron que 20 µg/mL de AEO era la Concentración inhibitoria (MIC) requerida para *C. albicans*; considerando que las concentraciones de AEO en 250 - 500 µg/mL facilitaron la inhibición completa del crecimiento de esta cepa, aunque las concentraciones efectivas (200 y 400 µg/mL) de AEO probado frente a *C. albicans* en este estudio se encuentra en el rango de concentraciones efectivas reportadas de AEO, las diferencias en los valores exactos de MIC de AEO requerido para la inhibición del crecimiento de *C. albicans* puede ser debido a la presencia de diferente quimiotipo, geotipo, cosecha y extracción del orégano.

Concluyen que el Aceite esencial de *Origanum vulgare* podría servir como agente anti-levadura altamente eficaz en la farmacología.

**Zuzarte M. et al. (2012)<sup>15</sup>.** Evaluaron la actividad antimicótica y los mecanismos de acción de un nuevo quimiotipo de *Lavandula multifida* de Portugal, especie perteneciente a la familia Lamiaceae. Los componentes

de dos quimiotipos de aceites esenciales fueron analizados por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masa (GS/MS) encontrando carvacrol con 41,5%. La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) fue de 0.16 µl/mL y la Concentración Mínima Letal (MLC) fue de 0,32 µl/mL. Por esta condición, concluye que esta especie puede ser muy útil en las terapias complementarias para tratar la candidiasis.

**Jnaid Y. et al. (2016)**<sup>31</sup>. Realizaron un estudio para determinar la composición química y actividad antimicótica del *Origanum vulgare* (orégano), sobre *Candida albicans*. Para el análisis de los componentes usaron el método de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GS/MS), encontrando 35 componentes entre las principales el carvacrol (3,90%), el Timol (1,09%). En cuanto a la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC), el estudio ha demostrado tener una fuerte actividad contra: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacilo cereus*, *Candida albicans*. La *concentración bactericida mínima* (MBC) fue valoradas por el método de microdilución en caldo (Microplacas con pozos) (Manhor *et al.* 2001). La inhibición de crecimiento bacteriano fue influenciada por la concentración del aceite esencial. El rango utilizado fue de 0,0487 µl/ml a 200 µl/mL. La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) fue 25 (µl/mL) y la Mínima Concentración Bactericida (MVB) 50 (µl/mL). Concluyendo que a mayor concentración del aceite esencial del orégano, menor es el crecimiento bacteriano.

**Suzuki Érika et al. (2013)**<sup>32</sup>. En Brasil, evaluaron el aceite esencial de orégano frente al mal olor de la transpiración, analizaron la composición química por el método de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (HR-GC), teniendo como resultado diecisiete componentes identificados, entre ellos destaca: γ-terpineno (30,5%) y carvacrol (15,7%); fueron sometidos frente a: *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Proteus. vulgaris* ATCC 13315, *Micrococcus\_luteus* ATCC 7468 y *Corynebacterium xerosis* IAL 105, mostrando que la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) se encuentra en el rango de 0,7 a 2,8 mg/mL.

**De Castro RD. et al. (2015)**<sup>33</sup>. Consideraron en su estudio las limitaciones de los agentes antimicóticos utilizados en las candidiasis orales y desarrollo de especies resistentes. Realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la actividad antimicótica del Timol contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, así como también el modo de acción combinada del Timol con un antimicótico sintético (Nistatina). La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y la Mínima Concentración Bactericida (MBC) sobre *Candida albicans* fue 39 µg/mL para *Candida tropicalis* 78 (µg/mL) y *Candida krusei* 39 (µg/mL). De los resultados obtenidos concluye que el Timol tiene acción antimicótica contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* y su efecto es probablemente el resultado de la interferencia con la síntesis y/o presencia de ergosterol en la membrana plasmática.

**Sharifzadeh A. et al. (2016)**<sup>34</sup>. Evaluaron la actividad antimicótica de aceites esenciales de plantas Iraníes (*Myrtus communis* (mirto o arrayán), *Zingiber officinale roscoe* (jengibre), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Trachyspermum ammi* (Apiaceae) y *Origanum vulgare* (orégano), contra especies de *Candida* resistentes al fluconazol, extraídas de pacientes con VIH positivo con Candidiasis Oro faríngea. El aceite esencial de las plantas, fueron obtenidas por el procedimiento de hidrodestilación. Las composiciones químicas de los aceites esenciales fueron determinadas por el método de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masa (GS/MS). En el orégano entre los más principales menciona: linalol y timol con 42 % y 25.10 % respectivamente. La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y la Mínima Concentración Bactericida (MBC) fueron de 300 µg/mL y 400 µg/mL respectivamente frente al Fluconazol con los mismos valores.

**Brandolt TM. et al. (2016)**<sup>35</sup>. Realizaron un estudio en el hospital Rio Grande do Sul, Brasil, para determinar la prevalencia de las especies de *Candida* en la mucosa vulva-vaginal de una población de 263 mujeres, entre abril del 2013 a octubre del 2014. Las muestras recolectadas fueron

procesadas microbiológicamente y sometidas al Miconazol. Se observó que la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) estuvo en el rango de 0,031 µg/mL a 8 µg/mL.

## **2.2. Bases teóricas**

- ***Estomatitis Sub Protésica***

La ESP es una inflamación crónica de la mucosa oral que afecta a individuos portadores de prótesis removible elaboradas con base de acrílico. Se observa principalmente en reborde alveolar residual de los maxilares superiores y mucosa del paladar. Se encontró con menor incidencia en reborde alveolar residual mandibular<sup>6, 36, 37</sup>. A esta patología se le ha dado varias denominaciones. En 1936 Cahn lo denominó “Dentadure Sore Mouth” traducido como boca dolorida por la dentadura y Pryor como “Chronic Dentadure Palatitis”, haciendo referencia a la cronicidad del proceso y su ubicación anatómica. En 1956 Fisher la llama “Estomatitis Venerata”, que en latín significa venenoso o embrujado. En 1963 Cawson la denomina “Denture Estomatitis” que es el término más aceptado en la lengua inglesa, por lo se recomienda el empleo del término “Estomatitis Sub Protésica”, que intenta resumir los aspectos más importantes de la enfermedad: inflamación y su asociación protésica<sup>1</sup>. A estas lesiones también se les denomina: “Inflamación Subplaca”, “Hiperplasia Papilar”, “Estomatitis por Prótesis”, “Estomatitis protésica” o “Palatitis subplaca”<sup>38-40</sup>.

La ESP se caracteriza por presentar lesión eritematosa persistente en el área de soporte biológico de la prótesis dental removible. Comienza con congestión en pequeñas zonas de la mucosa, se extienden y llega a confluir, incluso puede alcanzar toda la superficie cubierta por la prótesis. Estos cambios patológicos se caracterizan por la presencia de una lesión eritematosa brillante, edematosa e

hiperplásica, eventualmente con petequias hemorrágicas. Pueden presentar una proliferación fibroepitelial, observándose como proyecciones papilares que da un aspecto vegetante, principalmente en la superficie del paladar, debido a la interacción de la mucosa con microorganismos y la base de la prótesis. La mucosa inflamada muchas veces puede estar asociada a sensaciones de sabor desagradable, quemadura, ardor o prurito<sup>5, 6, 18,41</sup>. También se puede asociar al “síndrome de combinación” con formación de tejidos flácidos, reabsorción ósea del área anterior del paladar y extensión distal mandibular, pérdida de dimensión vertical y alteración del plano oclusal<sup>27</sup>.

La ESP es una patología que se observa con mayor frecuencia en mujeres y se presenta entre los 25 a 90 años. Su prevalencia se encuentra entre 45 a 65 años y se incrementa a medida que aumenta la edad<sup>5, 18, 19,37</sup>. Su diagnóstico es fundamentalmente clínico y se basa en el reconocimiento de lesiones de la mucosa afectada bajo la zona de soporte de una prótesis dental. Se observan modificaciones progresivas según la gravedad inflamatoria de la enfermedad hasta llegar a cambios fibroproliferativos en sus etapas más avanzadas y se clasifica de acuerdo al curso evolutivo<sup>1</sup>.

La clasificación de Newton (1962)<sup>42-44</sup> fue la más empleada y considera tres tipos, basados en la apariencia clínica de la inflamación de mucosa de los maxilares relacionados con una prótesis.

- **Tipo I:** Inflamación simple localizada en forma de puntos eritematosos.
- **Tipo II:** Inflamación simple generalizada difusa, en toda la superficie mucosa de soporte de la prótesis.
- **Tipo III:** Inflamación granular o papilar hiperplásica generalizada.

En 1985, esta clasificación fue modificada en tres grupos<sup>45, 46</sup>.

- **Grado I:** Signos inflamatorios mínimos, asintomáticos, pueden aparecer áreas hiperémicas localizadas o en forma de pequeños puntos eritematosos. Es la lesión mínima visible a la inspección.
- **Grado II:** Lesión francamente inflamatoria, puede observarse el dibujo de los contornos de la prótesis, la superficie mucosa es de color rojo brillante, aparecen áreas eritematosas difusas que pueden cubrirse total o parcialmente por un exudado blanco-grisáceo. Generalmente el paciente expresa alguna sensación subjetiva.
- **Grado III:** Lesión constituida por mucosa gruesa, con gránulos irregulares, a veces toma aspecto papilar con alteraciones máximas en la parte central de la mucosa palatina. La magnitud de los signos inflamatorios es variable y generalmente predominan los fenómenos proliferativos<sup>1</sup>.

En 2003 se propone una nueva clasificación de la ESP con el objetivo de evaluar la extensión de las lesiones con mayor precisión. Para lo cual se elabora un diagrama del paladar dividiéndolo el área palatina en 4 cuadrantes: un plano sagital desde la papila incisiva y un plano frontal a través de las rugosidades palatinas; las modificaciones fueron aplicadas a la sub clasificación de Newton tipo II y III como A o B, si la inflamación se presentó de 1 a 2 cuadrantes o de 3 a 4 cuadrantes, respectivamente. Esta modificación permitió que el tipo de inflamación sea referido como Newton I, II y III, además la extensión de la inflamación fue indicada por la clasificación en las subclases A o B. Esta clasificación explica alguna de las discrepancias y contradicciones encontradas en la literatura respecto a que la inflamación puede presentarse antes de la colonización micótica<sup>47</sup>.



Además, se señala que el diagnóstico de la ESP debe ser confirmado por la observación microscópica de *Candida* en las muestras orales o por su aislamiento en cultivos microbiológicos<sup>37</sup>.

Entre los principales factores que influyen en el inicio y progresión de la ESP se consideran:

- Deficiente hábito de higiene oral, que favorece la presencia de placa bacteriana y colonización de *Candida* en la superficie mucosa y protésica.
- Diferentes sustancias usadas en la limpieza de prótesis dental.
- El tipo de prótesis, tiempo de fabricación, malos hábitos como uso de la prótesis al dormir.
- Factores traumáticos causados por irregularidades o porosidades en la superficie acrílica de la prótesis, mala adaptación, desajuste y falta de retención.
- Oclusión y dimensión vertical no controlada.
- Factor dietético, determinados por excesiva ingesta de hidratos de carbono o falta de algunos nutrientes y vitaminas.
- Factor alérgico, por contacto a superficie acrílica de la prótesis, debido a liberación del monómero, formaldehído; antígenos liberados por microorganismos y respuesta del huésped.
- Enfermedades sistémicas con inmunosupresión, como: diabetes mellitus, anemias, VIH, leucemia; alteraciones renales, hipoparatiroidismo, déficit nutritivo y síndrome de Sjögren (xerostomía).
- La antibióticoterapia prolongada.

De todos los factores, la presencia de *Candida albicans* que están presentes en la cavidad oral es el más relacionado con la ESP<sup>3, 9, 12, 20, 41</sup>.

- **Microbiología de la estomatitis sub protésica**

La prótesis dental es el factor desencadenante más importante de ESP en pacientes no inmunodeprimidos. Altera las condiciones de la mucosa oral produciendo lesiones micro traumáticas que dificultan la llegada de anticuerpos de la saliva y facilita la formación de un medio ácido y anaerobio, que favorece la proliferación de hongos y desencadenamiento de la ESP<sup>48-50</sup>. También existen otros factores locales y ambientales que modifican el microambiente existente en la cavidad oral, como el tabaquismo, xerostomía, caries dental y uso de antibióticos<sup>51, 49, 52</sup>.

Para que se establezca un proceso infeccioso por candida, éstos deben adherirse a una superficie de acogida, proliferar y penetrar en la primera línea de defensa del huésped, que es la mucosa oral queratinizada o no queratinizada. Los cambios en la glicosilación de proteínas de superficie pueden exponer las estructuras hidrófobas de la proteína en la superficie de la célula, que afecta las propiedades de adherencia. Los cambios en las superficies de células de levadura pueden ser causadas por interacción cándida-huésped. Por ejemplo, la adhesión a células epiteliales bucales en humanos induce la síntesis de nuevas proteínas en *Candida albicans* y la expresión de proteínas de señal. Un posible mecanismo de pH bajo, producido por la actividad simbiótica del *Streptococcus mutans* puede promover la colonización oral por levaduras que se adhieren al epitelio y superficies acrílicas de la dentadura postiza. Otro mecanismo puede ser la naturaleza acidúrica y acidófila de las especies de Candida, que les permite prosperar en un medio de pH bajo<sup>51, 53</sup>.

La hipótesis de asociación entre el *Streptococcus mutans* y *Candiada albicans* se basa en mecanismos de virulencia y características bioquímicas, así como también en factores endógenos y exógenos del huésped, que favorecen la acción de ambos microorganismos en la cavidad bucal<sup>53-56</sup>.

La *Candida albicans* es considerada como la levadura más frecuente aislada en pacientes con ESP<sup>36, 39, 55</sup>. Esto tiene relación con la capacidad de adhesión a través de adherencias específicas que actúan sobre las células epiteliales de la mucosa palatina. También se observó que la *Candida albicans* fue la especie que se adhiere en mayor grado a las superficies, mientras que *C. Parapsilosis*, *C. Guillermoundii*, *C. Kefyr* y *C. Krusei* poseen capacidad limitada<sup>36, 55</sup>.

- **Orégano**

El Orégano es una especie nativa de la zona mediterránea. Existen más de dos docenas de diferentes especies que contienen aceites esenciales y que le otorgan olor característico. Desde tiempos inmemoriales se le reconoce por sus propiedades aromáticas. En la antigua Grecia se le llamaba “Alegría de la Montaña” y se le consideraba como símbolo de alegría y felicidad. Los antiguos egipcios consagraban la especie *Origanum* al Dios Osiris y lo tejían para fabricar coronas o guirnaldas que vestían durante sus rituales<sup>28</sup>.

- **Descripción botánica del orégano**

El orégano es una especie herbácea, perenne, rizomatoso, con tallos erectos, ramificados y vellosos. Alcanza una altura variable entre 0,30 y 0,70 m. Las hojas brotan de dos en dos en cada nudo, son enteras, ovales, opuestas, verdes vellosas en su cara inferior y lisas en la superior. Sus flores son pequeñas, dispuestas en espigas. Los pétalos no sobrepasan los 2 a 3 milímetros de longitud, son de diferentes colores: blanco, púrpura; dispuestas en inflorescencias terminales ramificadas; cáliz con cinco sépalos iguales, brácteas lanceoladas u ovales, semillas pequeñas, ovales de color marrón. Toda la planta posee pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática. Los tallos contienen sustancias tánicas. La parte útil de la planta son las hojas y sumidades floridas<sup>28, 57</sup>.

- **Clasificación científica.**

- La clasificación Taxonómica del orégano<sup>28, 58</sup>:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Asteridae
Orden	:	Lamiales
Familia	:	Lamiaceae
Subfamilia	:	Nepetoideae
Tribu	:	Mentheae
Género	:	Origanum
Especie	:	<i>Origanum vulgare</i>
Nombre vulgar	:	Orégano

- **Aceite esencial**

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Son sustancias transparentes de color amarillo limón.

- **Estructura química de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales contienen principalmente terpenoides volátiles formados por unidades de isopreno, unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Los compuestos más frecuentes se derivan del ácido mevalónico. Cada aceite integra por lo menos 100 compuestos químicos diferentes.

En un aceite esencial puede encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados (fenoles, alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), sustancias azufradas y nitrogenadas; estos grupos funcionales son responsables del aroma que suelen poseer<sup>28</sup>.

- **Composición química y características del aceite esencial**

Los aceites esenciales están constituidos por terpenos con actividad y composición química que varía de una especie a otra, debido a factores como quimiotipo y geotipo de la planta, considerando que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites<sup>69</sup>, donde tiene papel importante la densidad de la planta sembrada, el corte y la estación del año, el medio ambiente, la cantidad de agua usada en el riego e incluso la intensidad de luz natural o artificial usada en el invernadero<sup>28, 59</sup>.

Los derivados fenólicos, carvacrol y timol, han sido encontrados en diversas hierbas y especias incluyendo el orégano. Estas sustancias son monoterpenoides representativos de un pequeño grupo de compuestos aromáticos volátiles con olores intensamente pungentes, que son responsables de las fragancias y sensaciones de olor y sabor de muchas plantas. Estructural y biológicamente son muy diferentes y se clasifican hasta en 50 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *Origanum vulgare* son carvacrol y timol, cada uno con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis. Se ha observado que el incremento en porcentaje de timol provoca disminución en el contenido de carvacrol; de igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides: p-cimeno, cis-  $\beta$ -Terpineol,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno, limoneno y r-cimeno, entre otros; están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores al de los fenoles<sup>28, 60, 61</sup>.

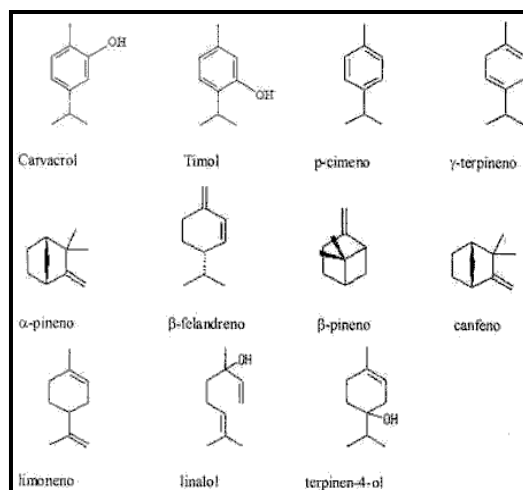


Figura A. Estructura química de los principales componentes del orégano<sup>28, 62</sup>.

### • Usos del Orégano

La Organización Mundial de la Salud estima que cerca de 80 % de la población en el mundo, usa extractos vegetales o sus compuestos activos para cuidados primarios de la salud. El orégano es una hierba aromática perenne, cuyas hojas, tallos y flores tienen diferentes usos populares.

En el tratamiento de<sup>28, 63, 64</sup>:

- Infecciones micóticas y microbianas.
- Trastornos gastrointestinales, respiratorios, irregularidades menstruales.
- Aplicación tópica del aceite esencial para tratamiento de infecciones cutáneas.

En la industria, el orégano es usado como<sup>28, 65, 66</sup>:

- Condimento, conservante y aromatizante de alimentos: carnes, embutidos, salsas, ensaladas.
- Aroma en elaboración de licores.

- Fragancia en perfumería, jabonería y cosmética.
- Componente activo de pomadas contra dermatitis.
- Fitofármacos para tratamiento de la Pediculosis, linimento antirreumático, desinfectante, cicatrizante.

- **Propiedades de los aceites esenciales**

Todos los aceites esenciales son antisépticos, cada uno tiene sus virtudes específicas y pueden ser analgésicos, fungicidas, diuréticos o expectorantes. La reunión de componentes de cada aceite actúa conjuntamente para darle una característica dominante, puede ser aromático, refrescante, estimulante o calmante.

El orégano como antimicrobiano y antifúngico, actúa contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aerobios y anaerobios: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* entre otros. Estas características también son importantes para la industria alimentaria ya que favorecen la inocuidad y estabilidad de los alimentos<sup>28, 26, 67</sup>.

En el organismo puede actuar de modo farmacológico, fisiológico y psicológico. Habitualmente produce efectos sobre diversos órganos o funciones de sistema, puede tener actividad antifúngica, antibacteriana, antiparasitaria, antiséptica, antimutagénica, anticarcinogénica y antiviral. Se puede considerar como una alternativa potencial para el tratamiento o prevención de trastornos crónicos como el cáncer. El orégano también es una fuente potencial de vitamina C, compuestos antioxidantes como los carotenoides y también actúan como repelente e insecticida. Existe evidencia científica limitada que confirma cualquiera de estos usos<sup>66, 68-70</sup>.

- ***Candida albicans***

### **Características**

El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre. La *Candida albicans* es la especie más importante, desde el punto de vista estomatológico, como agente etiológico de la ESP; habiéndose aislado de la cavidad bucal otras especies como *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*<sup>39, 41, 46, 48</sup>.

La *Candida albicans* es un microorganismo comensal, se alimenta de hidratos de carbono (azúcares), sustancias fermentadas (cerveza, vinagre) y embutidos; se encuentra en mucosas, sobre todo oral, digestiva y genital. Es un patógeno oportunista que en cantidades pequeñas es inocuo, se disemina cuando las condiciones son favorables. Si su crecimiento aumenta drásticamente puede ser devastador para la salud, debido a que excretan toxinas en el torrente sanguíneo que tiene efecto nocivo en el sistema nervioso e inmunológico<sup>71, 72</sup>.

### **Patogenia**

La cándida tiene en su superficie numerosas moléculas responsables de su adherencia a los tejidos del huésped, entre las que se encuentran: un receptor homólogo de la integrina humana CR 3, una lectina que se une con los azúcares de las células epiteliales y proteínas con manosa que se unen con las moléculas similares a la lectina de las células epiteliales.



Otros factores de virulencia son: aspartilproteínasa, que participa en la invasión tisular al degradar las proteínas de la matriz extracelular y una adenosina secretada, que bloquea la producción de radicales de  $O_2$  en los neutrófilos y su degranulación. Finalmente, la transición de formas levaduriformes a hifas es importante para la virulencia del hongo, debido a que parece que las hifas brotan fuera de las células, que las absorben. El agente causal de la moniliasis o candidiasis es la *Candida albicans*, aunque otros hongos de la especie pueden ser también patógenos para el hombre. La *Candida albicans* produce una respuesta inmunitaria profunda, que ocasiona varias de las manifestaciones clínicas de la candidiasis Sub Protésica<sup>39, 73</sup>.

- **Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica de la levadura involucrada como agente etiológico de la ESP es<sup>53</sup>:

Reino : *Fungi*  
División : *Deuteromycota*  
Clase : *Blastomycetes*  
Familia : *Cryptococcaceae*  
Género : *Candida*  
Especie : *albicans*

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis general

El Aceite Esencial de Orégano tiene efecto antimicótico *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésicas.

#### 3.2. Hipótesis específica

- Existen diferencias entre los efectos antimicóticos *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L, (Jauja y Tacna) *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) a concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%, sobre cepas de *Candida albicans*, procedente de la Estomatitis Sub Protésica.
- Existen diferencias en los efectos antimicóticos *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y el *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) al 12,5%, 25%, 50% y 100%, frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).
- Existe diferencias entre las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas de *Candida albicans* procedente de la Estomatitis Sub Protésica.
- Existe diferencias en el quimiotipo *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) de acuerdo a su geotipo.

### 3.3. Identificación de variables

#### *Variable independiente*

Aceite esencial de orégano

#### *Variable dependiente*

Efecto antimicótico del Aceite esencial de Orégano en *Candida albicans*.

### 3.4. Operacionalización de variables

**Tabla 1. Operacionalización de variables**

	Variable	Conceptualización	Dimensiones	Indicador	Escala	Categoría
I N D E P E N D I E N T E	Aceite esencial de orégano	Aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de plantas aromáticas, son transparentes de color amarillo limón, Son biosintetizadas por las plantas, dan el aroma característico de las flores, árboles, frutos, hierbas.	Especies de orégano	Lolización geográfica	Nominal	Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> (Jauja), <i>Origanum vulgare</i> (Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito), <i>Origanum x majoricum</i> (Nigra) (Arequipa)
			Concentraciones de Aceite esencial	Aceites esenciales en diferentes concentraciones: 12,5%, 25%, 50% y 100%	Ordinal	Concentraciones 12,5%, 25%, 50% y 100%,
			Composición química	Elementos químicos	Nominal	Carbacrol, Timol, etc.
D E P E N D I E N T E	Efecto antimicótico del Aceite esencial de Orégano en <i>Candida albicans</i>	Propiedad Bioquímica que permite inhibir el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	Efecto antimicótico del aceite esenc	Halos de inhibición (medido en mm)	Ordinal	Escala de Sensibilidad S. nula: < 8mm S. límite 9-14 mm S. media 15-19 mm S. sumamente sensible > 20 mm
				Concentraciones	Ordinal	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

### 3.5. Matriz de consistencia

TABLA 2. Matriz de consistencia

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL
¿Los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> nigra (Arequipa) tienen efecto antimicótico <i>in vitro</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> procedentes de la Estomatitis Sub Protésica?	Evaluar el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del Aceite Esencial de Orégano sobre cepas de <i>Candida albicans</i> procedentes de la Estomatitis Sub Protésica.	Aceite Esencial de Orégano tiene efecto antimicótico <i>in vitro</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> procedentes de la Estomatitis Sub Protésica.
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICA
<ul style="list-style-type: none"> <li>¿Los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra)(Arequipa) tienen efecto antimicótico <i>in vitro</i> en concentración de 12,5%, 25%, 50% y 100% sobre cepas de <i>Candida albicans</i>, procedente de la Estomatitis Sub Protésica ?</li> <li>¿La Concentración mínima Inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra)(Arequipa), es similar al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas <i>Candida albicans</i> procedente de la Estomatitis Sub Protésica ?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el efecto antimicótico <i>in vitro</i> de los aceites esenciales <i>Origanum vulgare</i> L, (Jauja y Tacna), (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) sobre cepas de <i>Candida albicans</i></li> <li>Comparar los efectos antimicóticos <i>in vitro</i> de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) en concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%.</li> <li>Comparar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas de <i>Candida albicans</i> procedente de la Estomatitis Sub Protésica.</li> <li>Determinar el quimiotipo <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) de acuerdo a su geotipo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Existe diferencia entre el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L, (Jauja y Tacna) <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) a concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%, sobre CEPAS de <i>Candida albicans</i>, procedente de Estomatitis Sub Protésica.</li> <li>Existen diferencias en el efecto antimicótico <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L, (Jauja y Tacna) <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) al 12,5%, 25%, 50% y 100%, frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).</li> <li>Existe diferencias entre las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) con Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), sobre cepas de <i>Candida albicans</i> procedente de la Estomatitis Sub Protésica.</li> <li>Existe diferencias en el quimiotipo <i>Origanum vulgare</i> L (Jauja y Tacna), <i>Origanum x intercedens</i> (chinito) y <i>Origanum x majoricum</i> (nigra) (Arequipa) de acuerdo a su geotipo.</li> </ul>

## **IV METODOLOGÍA**

### **4.1. Tipo y diseño de investigación**

La investigación es experimental *in vitro*, prospectivo, longitudinal.

### **4.2. Unidad de análisis**

Cultivo de cepa de *Candida albicans* aislados de la superficie de prótesis de pacientes con ESP que acudieron a la Clínica de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la UNMSM, sembradas en Agar Sabouraud Glucosado y sometidas a la acción de cuatro tipos de aceite esencial de orégano, por el método de difusión en concentraciones de 12,5% 25%, 50% y 100%, utilizándose como control positivo Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%), el control negativo estuvo constituido por discos estériles de papel Whatman Nro. 1 de 6 mm de diámetro embebidos con Dimetilsulfóxido (DMSO).

### **4.3. Selección y obtención de la muestra**

#### **4.3.1. Criterios de inclusión**

- Cepas de Pacientes portadores de prótesis dental removible que no presenten enfermedad sistémica crónica y no estén recibiendo tratamiento antibiótico o antimicótico.
- Cepas de pacientes de ambos sexos, de 25 a 70 años, con diagnóstico de Estomatitis Sub Protésica.
- Cepas de *Candida albicans* obtenidas y aisladas de superficie de prótesis dental de pacientes con Estomatitis Sub Protésica.

#### **4.3.2. Criterios de exclusión**

- Cepas de paciente con prótesis dental removible que no presentaran cuadro de Estomatitis Sub Protésica.
- Cepas de paciente con enfermedad sistémica crónica o estar recibiendo tratamiento antibiótico o antimicótico.

#### **4.4. Técnica de recolección de datos**

##### ***Orégano***

##### **Recolección e identificación taxonómica**

Se recolectó muestras de cuatro diferentes especies de orégano de diferentes lugares del Perú, considerando que, por el geotipo, presentarían diferente quimiotipo<sup>74</sup>:

- *Origanum vulgare Labiate* (Jauja).
- *Origanum vulgare Labiate* (Tacna).
- *Origanum x intercedens* (chinito) (Arequipa),
- *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa).

##### ***Origanum vulgare L (Jauja).***

La muestra se recolectó en el mes de noviembre del 2012, en el distrito de los Molinos, al Este de la ciudad de Jauja, provincia del departamento de Junín, Región Central del Perú. Se ubica en las coordenadas Latitud 11°44'00", longitud 75°26'37", altitud 3430 m s.n.m. Tiene superficie de 312,17 km<sup>2</sup>, el clima corresponde a la región sierra siendo variado de acuerdo a las estaciones, templado, seco y lluvioso en los meses de diciembre a abril, con temperatura promedio de 14 a 18°C, y en los meses de mayo a

noviembre, corresponde al verano, llegando a descender la temperatura a niveles bajo cero en los meses de junio y julio. Estas características le otorgan al clima de Jauja ser uno de los más benignos del planeta<sup>75, 76</sup>.

El traslado de la muestra se realizó en estado fresco al laboratorio de La Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, para la extracción de aceite esencial.

La clasificación taxonómica fue realizada en el Laboratorio del Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural, de la UNMSM. El espécimen fue registrado con constancia Nro. 355-USM-2012 (Anexo 9.3.1).

#### ***Origanum vulgare* L (Tacna).-**

La muestra se recolectó en el mes de mayo del 2013, en Ilabaya, uno de los tres distritos pertenecientes a la provincia de Jorge Basadre, en el Departamento de Tacna, en la Región Sur del Perú. Se ubica en el extremo norte de la mencionada provincia; a una altitud de 1380 m s.n.m es una tierra de contrastes, donde los valles costeros, las pampas desérticas y las alturas andinas concentran la mayor parte de su biodiversidad; su ecosistema es muy variado con un clima suave durante la mayor época del año<sup>77, 78</sup>.

El traslado de la muestra se realizó en estado fresco al laboratorio de La Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, para la extracción de aceite esencial.

La clasificación taxonómica fue realizada en el Laboratorio del Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural, de la UNMSM. El espécimen fue registrado con constancia Nro. 176-USM-2013. (Anexo 9.3.2)

### ***Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra)**

Las muestras fueron recolectadas en el distrito de Tiabaya, Arequipa, en el mes de Julio del 2013, el clima en esta época es frío y seco, con lluvias entre enero y marzo. Las muestras se expusieron al medio ambiente para su parcial deshidratación y se transportó al laboratorio de La Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM en estado semideshidratadas para la extracción de los aceites esenciales, utilizándose las hojas y flores. Su clasificación taxonómica fue publicada en el Boletín Técnico Arequipa - 2010 del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), del Ministerio de Agricultura<sup>78, 79</sup>.

Estas dos variedades se cultivan en huertas y es vendida a baja escala en los mercados locales del distrito de Tiabaya, que es uno de los 29 distritos que conforman la provincia de Arequipa en el Departamento de Arequipa, al sur del Perú, se encuentra ubicada a 30 km. al noreste de la ciudad, cerca del volcán Misti y Pichu-Pichu. Sus coordenadas centrales se ubican a 71° 24' al oeste y 16° 24' al sur, tiene un área total de 36,200 has. y está ubicada a una altitud de 2970 m s.n.m.<sup>88</sup>. Estas especies también se cultivan en Huambo, Quiscos, El Cural, Polobaya, Yarabamba y Quequeña, distritos que conforman las provincias de Arequipa y Caylloma en el Departamento de Arequipa, ocupan una extensa región por lo que su territorio representa los accidentes más diversos: cadenas de cerros, llanuras, altiplanicies, quebradas y cañones; algunas se encuentra en la parte inferior del Cañón del Colca y en la vertiente oriental de los volcanes Misti y Chachani; su altitud está entre 2500 a 5000 m s.n.m.<sup>76</sup>.

### **Extracción de aceite esencial de orégano**

El proceso de extracción de aceites esenciales de orégano, se realizó en el laboratorio de La Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, utilizando hojas y flores de la planta. Se usó la técnica de destilación por



arrastre con vapor de agua en un equipo de 10 litros (Anexo: 4 fotograf. 1). Las condiciones de operación del equipo de extracción fueron: tiempo tres horas, densidad de lecho 200 g/L y presión de vapor 0,32 psi (Libra por pulgada cuadrada); recolectándose el aceite en un vaso florentino para su decantado. La deshidratación del aceite obtenido se efectuó utilizando sulfato de sodio anhidro ( $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ) y se obtuvo un rendimiento promedio de 4,07 mL de aceite/Kg de hojas y flores frescas y 19.0 mL de aceite/Kg de hojas y flores secas.

### **Composición química del aceite esencial del orégano**

El estudio de la composición química del aceite esencial de orégano se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, la muestra se sometió a un análisis por Cromatografía de Gases / Espectrometría de masas (CG/EM).

### **Procedimiento de análisis de composición química**

El análisis se realizó en las siguientes condiciones:

- Equipo Cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 7890 A con detector de masas 5975C.
- Columna: DB-5ms, 325°C: 60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$
- Rampa de temperatura: 100°C por 10 min, 1°C/min hasta 120°C, 5°C/min hasta 150°C, 5°C/min hasta 200°C manteniéndose por 1 minuto y finalmente 5°C/min hasta 270°C.
- Tiempo de corrida: 52,33 min
- Inyección: 1  $\mu\text{L}$
- Split: 100: 1
- Gas portador: He, 20,443 cm/sec

- Muestra: se diluyó 20 µL de muestra en 1 mL de diclorometano

La identificación de los compuestos se realizó utilizando los índices de retención de Kovats, usando una serie de n-alcanos (C6-C32) y mediante comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de la librería de espectros Wiley.

La cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto.

Para el análisis estadístico se tuvo en cuenta únicamente el porcentaje relativo de timol como componente mayoritario y de interés para el presente estudio por sus propiedades antioxidantes y antimicóticas.

Para el estudio por (CG/EM), a los aceites esenciales se les codificó de la siguiente manera:

- *Origanum x intercedens* (chinito): “**AEACH1**”
- *Origanum x majoricum*, (nigra): “**AEANE-2**”
- *Origanum vulgare* L (Tacna): “**AETA-3**”
- *Origanum vulgare* L (Jauja): “**AEJA-4**”

El análisis de los AEO por (CG/EM), permitió identificar porcentualmente los componentes químicos. Tablas 5-9 y Figuras 2-5.

### ***Candida albicans***

#### **Recolección de la muestra**

Se seleccionaron al azar a 10 pacientes de ambos sexos, entre 25 y 70 años, portadores de prótesis dental removibles superior, con base de acrílico que presentaron Estomatitis Sub Protésica diagnosticada clínicamente en el estadio III según la clasificación de Newton.

Se utilizó datos de historias clínicas de la Facultad de Odontología para el diagnóstico.

Se consideraron sólo las muestras que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Las muestras se tomaron realizando hisopados de la superficie de prótesis que estuvieron en contacto con mucosa de paladar de paciente con Estomatitis Sub Protésica, empleando un hisopo estéril por paciente. Las muestras fueron colocadas en solución de ClNa 0,9%, y trasladada inmediatamente al laboratorio de Microbiología para su sembrado.

### **Siembra de las muestras**

Cada muestra fue sembrada con hisopo estéril en placas petri con medio de Agar Sabouraud Glucosado para crecimiento de *Candida*. Una vez sembradas las muestras, fueron incubadas a 37°C, en condiciones de aerobiosis y observándose luego de 24, 48 y 72 horas.

### **Observación macroscópica**

En los casos donde hubo crecimiento de levaduras, se seleccionaron colonias de acuerdo a sus características con un asa de platino previamente esterilizada. Se tomó un inóculo y se resembró en CHROMagar, medio selectivo y de diferenciación para la especie *Candida albicans*, y se incubó a 37°C por 24 horas en condiciones de aerobiosis.

Luego del tiempo de incubación apropiada, se realizó observaciones macroscópicas de cada uno de los medios para determinar la existencia y características de crecimiento de *Candida* (colonias). La observación macroscópica en medio cromogénico, nos permitió la identificación presuntiva de *C. albicans* (colonias verdes).

### **Observación microscópica**

A partir de las colonias obtenidas se realizó un examen directo en una lámina portaobjetos para detectar presencia de levaduras empleando microscopio de luz a un aumento de 400x. A cada colonia se le agrega la coloración de Gram para su respectiva identificación.

### **Determinación de la especie**

- Se realizaron dos pruebas rápidas:
- Producción de tubo germinal (filamentación en suero)
- Producción de Clamidosporas
- Las cepas de *Candida albicans* se aislaron e identificaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

### **Determinación del efecto antimicótico**

#### **Estandarización del Inóculo**

Las cepas identificadas como *Candida albicans* fueron suspendidas en solución de ClNa 9% ajustando su concentración según la escala de Mac Farland N° 1 -  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL -  $3 \times 10^8$  UFC/mL, para el inóculo.

#### **Dilución de las muestras de aceite esencial**

Se realizaron diluciones de cada muestra de AEO, ajustando sus concentraciones a 12,5%, 25%, 50%, y 100%; se utilizó Dimetilsulfóxido (DMSO), solvente altamente polar.

#### **Procedimiento para la prueba experimental**

- La prueba se realizó mediante el método de difusión con discos estériles de papel Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro. Se colocó 100 µL del inóculo sobre una placa Petri con medio de Agar Sabouraud Glucosado. Se extendió con un hisopo estéril en toda la placa.
- Se impregnó discos por saturación con 10,0 µL de los AEO estudiados al 12,5%, 25%, 50%, y 100% de dilución. Se usó como control positivo C (+) 10,0 µg/mL de Miconazol (gel oral 20 mg/g.) y

10,0 µg/mL de Clorhexidina (colutorio 0,12%) y como control negativo C (-) 10,0 µg/mL Dimetilsulfóxido (DMSO).

- Las placas se sometieron a incubación a 37°C en condiciones de aerobiosis, hasta por 72 horas.
- Las observaciones se realizaron cada 24 horas, efectuándose registró del halo de inhibición formado alrededor de cada disco para determinar su capacidad antimicótica.

### **Análisis de datos**

Se registraron los resultados en la ficha de recolección de datos diseñados para la investigación en forma secuencial, luego se transferieron a una base de datos electrónica con campos de ingreso controlados en Microsoft Office Excel 2010. Posteriormente fueron analizados con la asistencia del software Stata-v14 y SPSS 23. El análisis comprendió:

Para el análisis univariado y descriptivo se utilizarán:

Medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas (halos de inhibición de los aceites esenciales del orégano, Clorexhidina y Miconazol).

Antes del análisis bivariado, Las variables cuantitativas en escala de razón serán sometidas a las pruebas de normalidad, utilizando para ello los métodos gráficos (diagrama de caja y bigotes, gráficos de dispersión) y de contraste de hipótesis siendo el de Shapiro-Wilk ( $n < 30$ ) el adecuado no cumpliendo este supuesto, por tanto se utilizaron las pruebas no paramétricas, para la comparación de variables cuantitativas y encontrar las diferencias de mas de dos grupos independietes se utilizaron, la prueba de H de Kruskall-Wallis .

La actividad antimicótica de los cuatro aceites esenciales del orégano sobre *Candida albicans* se determinó en función al diámetro del halo

de inhibición en mm. Las pruebas se realizaron empleando discos de papel Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro, que fueron impregnados con 10,0 µg/mL de aceite esencial de cada una de las especies estudiadas en concentraciones de 12,5%, 25%, 50% y 100%. Se usó como control positivo (C+) 10,0 µg/mL de Miconazol (gel oral 20 mg/g.) y 10,0 µg/mL de Clorhexidina (colutorio 0,12%).

Los valores de sensibilidad según el método de aromatograma de Duraffoourd son<sup>26, 79</sup>:

- (1) Sensibilidad nula: < 8 mm
- (2) Sensibilidad límite: 9 a 14 mm
- (3) Sensibilidad media: 15 a 19 mm
- (4) Sensibilidad sumamente sensible: > 20 mm.

#### **EQUIVALENCIA DE VOLUMEN A MASA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO**

- 100% de concentración de AEO equivale a 9,234 µg/mL de AEO
- 50% de concentración de AEO equivale a 4,617 µg/mL de AEO
- 25% de concentración de AEO equivale a 2,309 µg/mL de AEO
- 12,5% de concentración de AEO equivale a 1,154 µg/mL de AEO

#### 4.4.1 PRUEBA DE HIPÓTESIS

- **HIPÓTESIS GENERAL**

El Aceite Esencial de Orégano tiene efecto antimicótico *in vitro* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica.

Hipótesis estadística

H0: No existen diferencias entre las medianas de los halos inhibitorios para *Candida albicans* de los diferentes aceites esenciales

H1: Por lo menos dos grupos difieren respecto a la mediana de los halos inhibitorios para *Candida albicans* de los diferentes aceites

Nivel de significación:  $\alpha = 0.05$

Estadístico de prueba: H de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test		
oregano	Obs	Rank Sum
Origanum vulgare L (Jauja)	7	41.00
Origanum vulgare L (Tacna)	7	148.00
Origanum x intercedens (chinito)	7	106.50
Origanum x majoricum (nigra)	7	110.50

chi-squared = 12.516 with 3 d.f.  
probability = 0.0058

chi-squared with ties = 12.658 with 3 d.f.  
probability = 0.0054

Regla de decisión:

Si  $p < 0.05$ , se rechaza  $H_0$

Si  $p \geq 0.5$ , no se rechaza  $H_0$

Decisión y conclusión:

Siendo  $\chi^2=12.65$  y  $p=0.0054$ , se rechaza  $H_0$ , y se concluye que por lo menos dos grupos difieren respecto a la mediana de los halos inhibitorios para *Candida albicans* de los diferentes aceites

- **HIPÓTESIS ESPECÍFICA**

Existen diferencias en el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L, (Jauja y Tacna) *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) al 12,5%, 25%, 50% y 100%, frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).

#### **Hipótesis estadística**

$H_0$ : No existen diferencias entre las medianas de los halos inhibitorios para *Candida albicans* según concentración de los diferentes aceites esenciales frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).

$H_1$ : Por lo menos dos grupos difieren respecto a la mediana de los halos inhibitorios para *Candida albicans* de los diferentes aceites esenciales frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%). Nivel de significación:  $\alpha= 0.05$

Estadístico de prueba: H de Kruskal-Wallis



Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test		
concen~n	Obs	Rank Sum
100%	7	223.50
12.5%	7	87.00
25%	7	115.50
50%	7	174.00
C (+)	7	273.00
C (-)	7	30.00

chi-squared = 38.600 with 5 d.f.  
 probability = 0.0001  
  
 chi-squared with ties = 38.925 with 5 d.f.  
 probability = 0.0001

Regla de decisión:

Si  $p < 0.05$ , se rechaza  $H_0$  Si  $p \geq 0.5$ , no se rechaza  $H_0$

Decisión y conclusión:

Siendo  $\chi^2 = 12.65$  y  $p = 0.0001$ , se rechaza  $H_0$ , y se concluye que por lo menos dos grupos difieren respecto a la mediana de los halos inhibitorios para *Candida albicans* de los diferentes aceites esenciales frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).

## V. RESULTADOS

En base a los procedimientos realizados en el presente estudio y de acuerdo a los objetivos e hipótesis planteadas, los resultados obtenidos fueron:

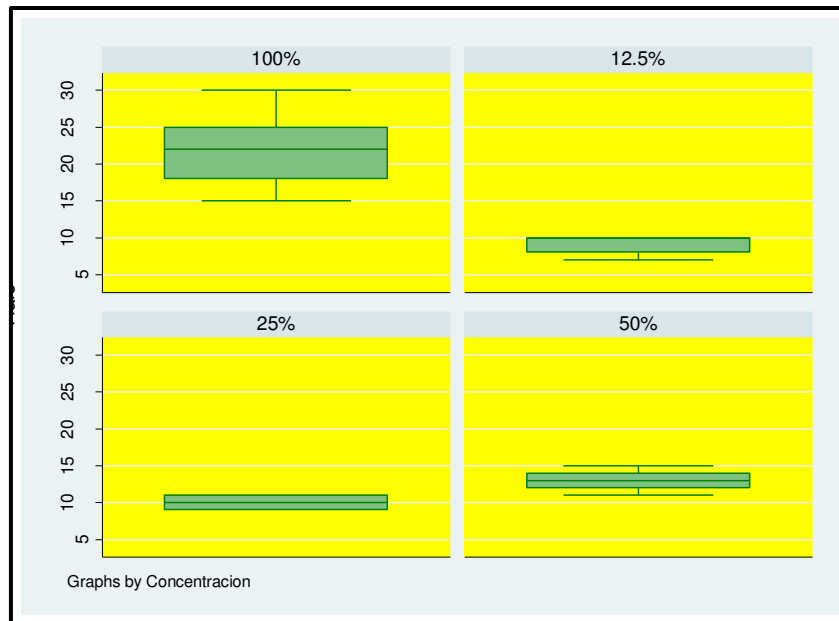
**Tabla 3. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) según concentración de *Origanum x vulgare* L (Tacna).**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
<b>100%</b>	7	22.14	5.01	22	3.5	15 - 30	0.001*
<b>50%</b>	7	13	1.41	13	1	11-15	
<b>25%</b>	7	10.14	0.90	10	1	9-11	
<b>12.5%</b>	7	9	1.30	10	1	7- 10	

**\*Prueba H de Kruskal-Wallis    p <0.05 significativo    chi2=23.31**

La tabla 3 muestra las diferencias de las medidas de tendencia central con respecto al Halo de inhibición (mm) según la mediana, la que muestra el mayor valor (Me=22) corresponde a una concentración del 100%

**Figura 1. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x vulgare L* (Tacna)**



En la fig.1, se muestra la comparación utilizando los gráficos de cajas del halo de inhibición (mm) según la concentración del *Origanum x vulgare L* (Tacna) mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$ , ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 23.31$ ), Se evidencia también que hay incremento de dicha medida, de acuerdo al incremento de la concentración del *Origanum x vulgare L* (Tacna), los valores hallados son superiores respecto a las demás muestras evaluadas.

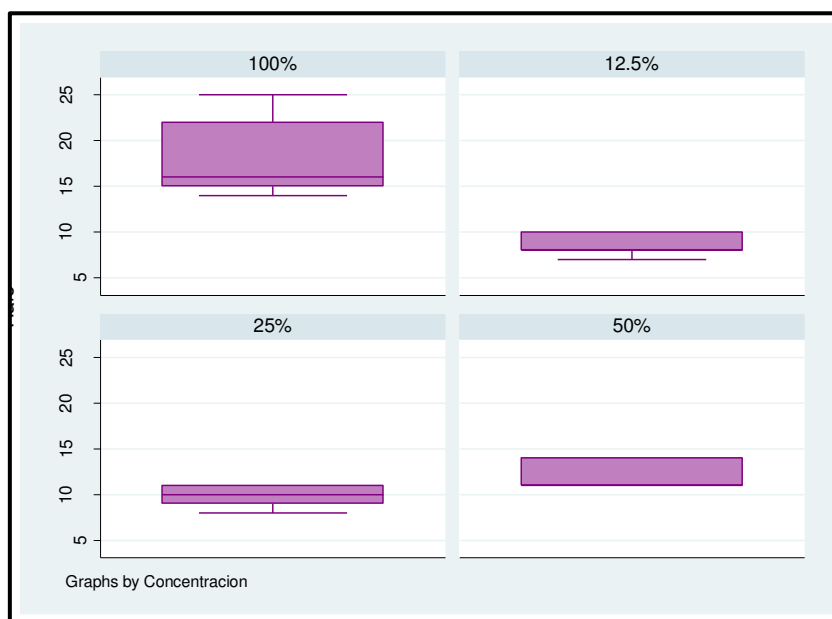
**Tabla 4. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) según concentración de *Origanum x intercedens* (Chinito).**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	18	4.04	16	3.5	14 - 25	0.001*
50%	7	12.14	1.47	11	1.5	11- 14	
25%	7	9.71	1.11	10	1	8 -11	
12.5%	7	8.57	1.13	8	1	7- 10	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 22.74$

En la tabla 4 y fig. 2, se muestran las diferencias de las medidas de tendencia central con respecto al Halo de inhibición (mm), mediante la prueba H de Kruskal-Wallis se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 22.74$ ). Se evidencia también que se incrementa dicha medida, de acuerdo al incremento de la concentración del *Origanum x intercedens* (Chinito).

**Figura 2. Comparación del halo de inhibición (mm) según concentración de *Origanum x intercedens* (Chinito)**



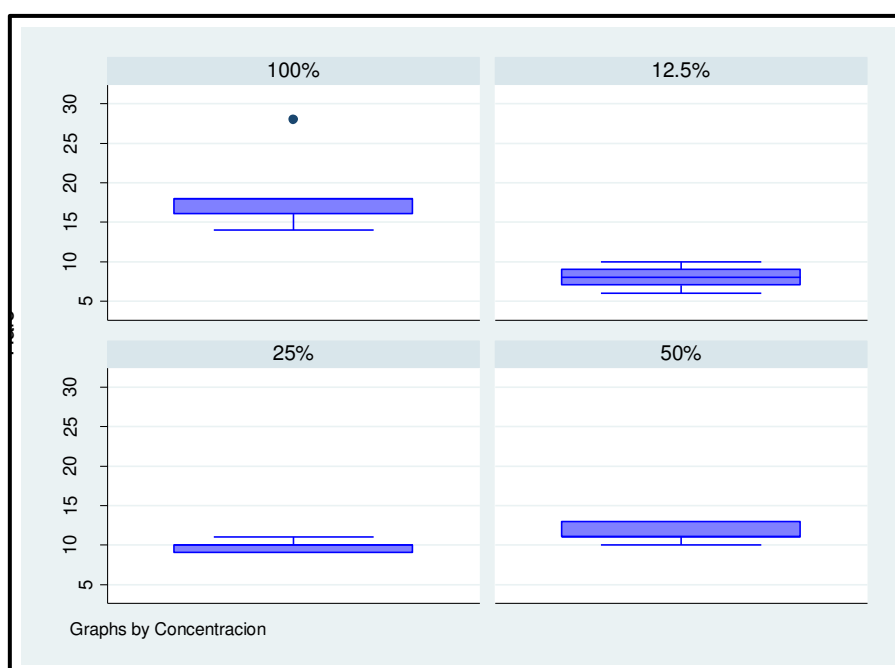
**Tabla 5. Medidas de tendencia central y dispersión del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x majoricum* (Nigra).**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	18.29	4.54	18	1	14 - 28	0.001*
50%	7	11.57	1.13	11	1	10 - 13	
25%	7	9.86	0.69	10	0.5	9 - 11	
12.5%	7	8	1.30	8	1	6 - 10	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 23.67$

En la tabla 5 y fig. 3, se muestran las diferencias de las medidas de tendencia central con respecto al Halo de inhibición (mm), mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 23.67$ ). Se evidencia también que se incrementa dicha medida de acuerdo al incremento de la concentración del *Origanum x majoricum* (Nigra).

**Figura 3. Comparación del halo de inhibición (mm) según concentración de *Origanum x majoricum* (Nigra)**



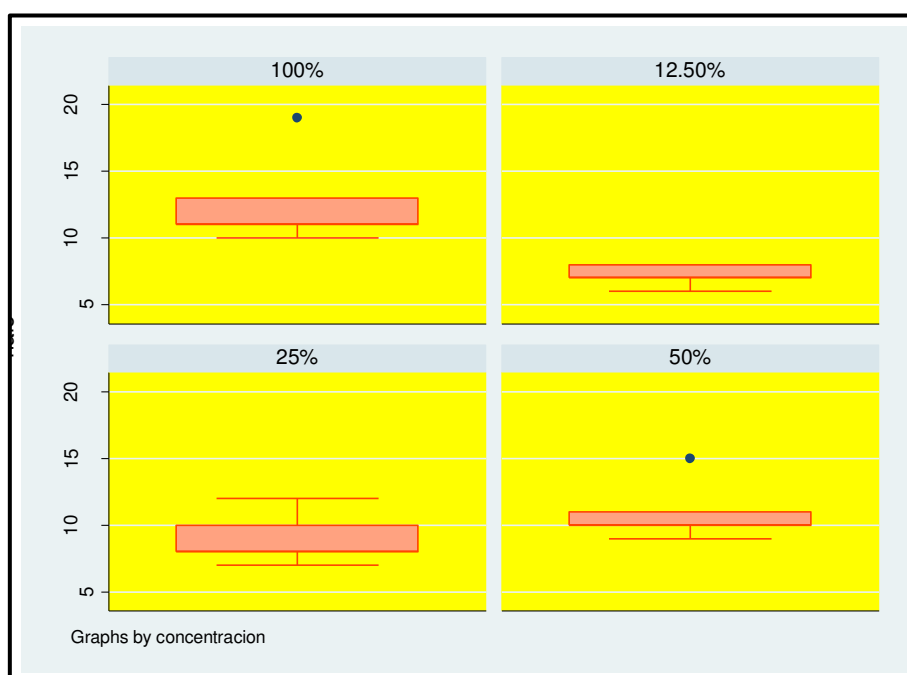
**Tabla 6. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x vulgare L* (Jauja)**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	12.43	3.05	11	1	10 - 19	0.0003
50%	7	10.71	1.98	10	0.5	9-15	
25%	7	8.86	1.68	8	1	7-12	
12.5%	7	7.14	0.70	7	0.5	6- 8	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 18.87$

En la tabla 6 y fig. 4, se muestran las diferencias de las medidas de tendencia central con respecto al Halo de inhibición (mm), mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 23.67$ ). Se evidencia también que se incrementa dicha medida de acuerdo al incremento de la concentración del *Origanum x vulgare L* (Jauja). Los valores hallados son inferiores respecto a las demás muestras evaluados

**Figura 4. Comparación del halo de inhibición (mm) según concentración de *Origanum x vulgare L* (Jauja)**



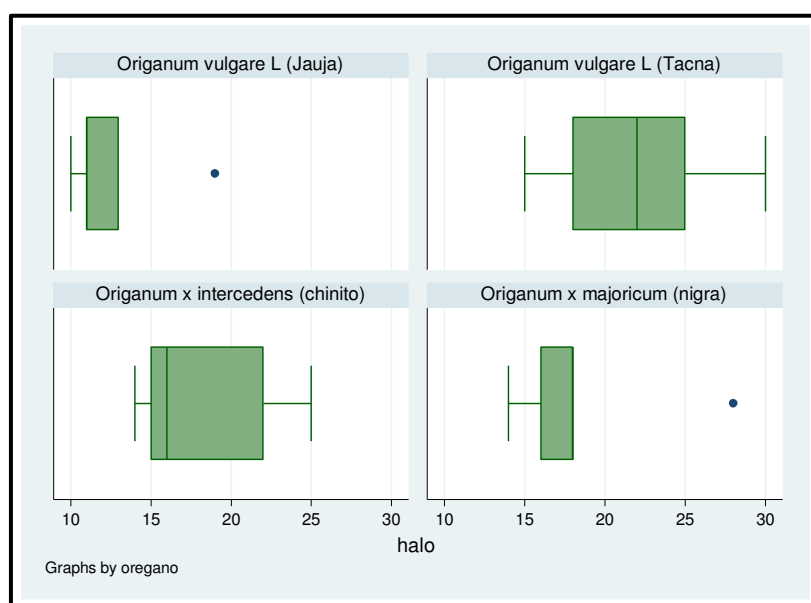
**Tabla 7. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 100%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja)	7	12.43	3.05	11	1	10 - 19	0.005*
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna)	7	22.14	5.01	22	3.5	15-30	
<i>Origanum intercedens</i> (chinito)	7	18	4.04	16	3.5	14-25	
<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	7	18.29	4.54	18	1	14-28	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis p <0.05 significativo chi2=12.65

En la tabla 7, y fig. 5, se muestra que existen diferencias entre los diversos aceites de oréganos para la concentración de 100% en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 23.67$ ). Siendo *Origanum x vulgare* L (Tacna), el de mejor efecto, y el de menor efecto *Origanum x vulgare* L (Jauja).

**Figura 5. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 100%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***



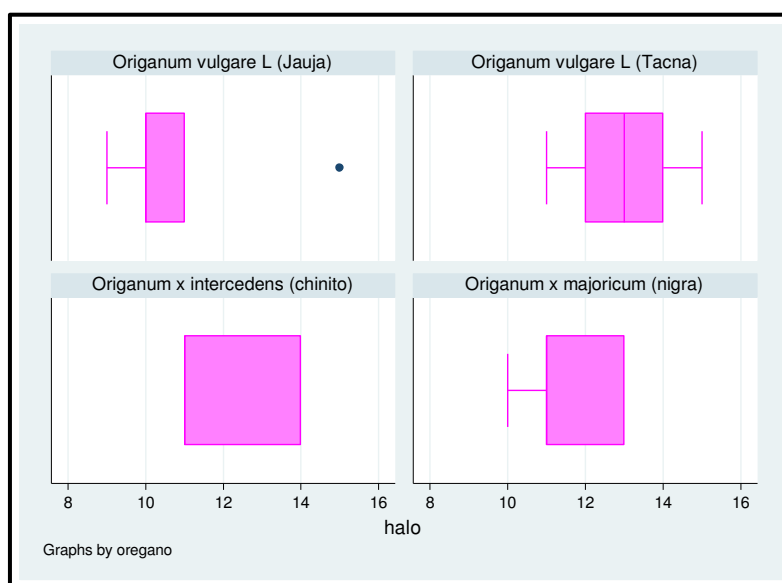
**Tabla 8. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición (mm) de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 50%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja)	7	10.71	1.98	10	1	11 - 15	0.03*
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna)	7	13	1.41	13	1	11-15	
<i>Origanum x intercedens</i> (chinito)	7	12.14	1.46	11	1.5	11-14	
<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	7	11.57	1.13	11	1	10-13	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2=8.71$

En la tabla 8, y fig. 6, se muestra que existen diferencias entre los diversos aceites de oréganos para la concentración de 50% en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p=0.03$ ,  $\chi^2=8.71$ ). Siendo *Origanum x vulgare* L (Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) *Origanum x majoricum* (nigra), de efectos similares, superiores al *Origanum x vulgare* L (Jauja).

**Figura 6. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 50%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***





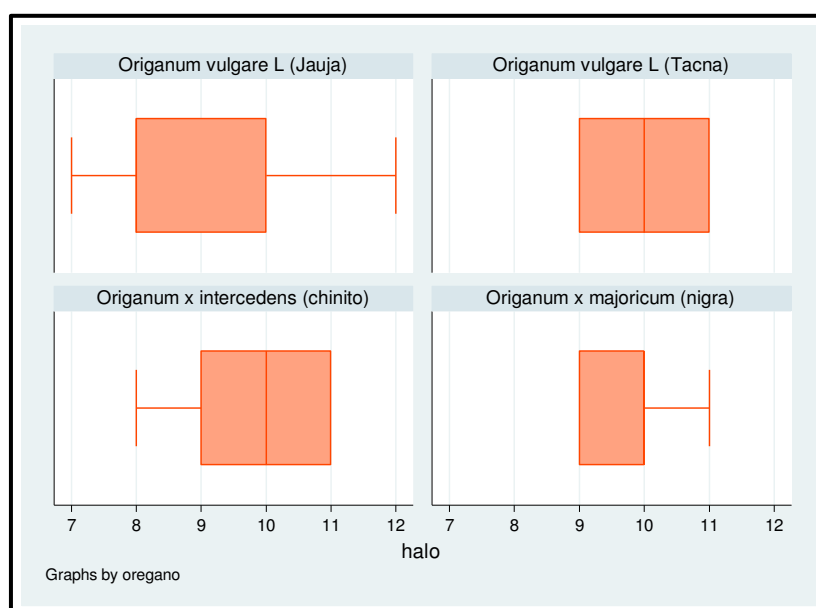
**Tabla 9. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición(mm) de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 25%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***

Concentraci ón	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min- max	p
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja)	7	8.86	1.68	8	1	7 - 12	0.22*
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna)	7	10.14	0.89	10	1	9 - 11	
<i>Origanum x intercedens</i> (chinito)	7	9.71	1.11	10	1	8 - 11	
<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	7	9.86	0.69	10	0.5	9 - 11	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$  no significativo  $\chi^2 = 4.40$

En la tabla 9, y fig. 7 se muestra las diferencias entre los diversos aceites de oréganos para la concentración de 25% en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis se comprueba que las diferencias no son estadísticamente significativas  $p > 0.05$  ( $p = 0.22$ ,  $\chi^2 = 4.40$ ). Siendo *Origanum x vulgare* L (Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) *Origanum x majoricum* (nigra), *Origanum x vulgare* L (Jauja) de efectos similares.

**Figura 7. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 25%, sobre cepa aislada de *Candida albicans*.**



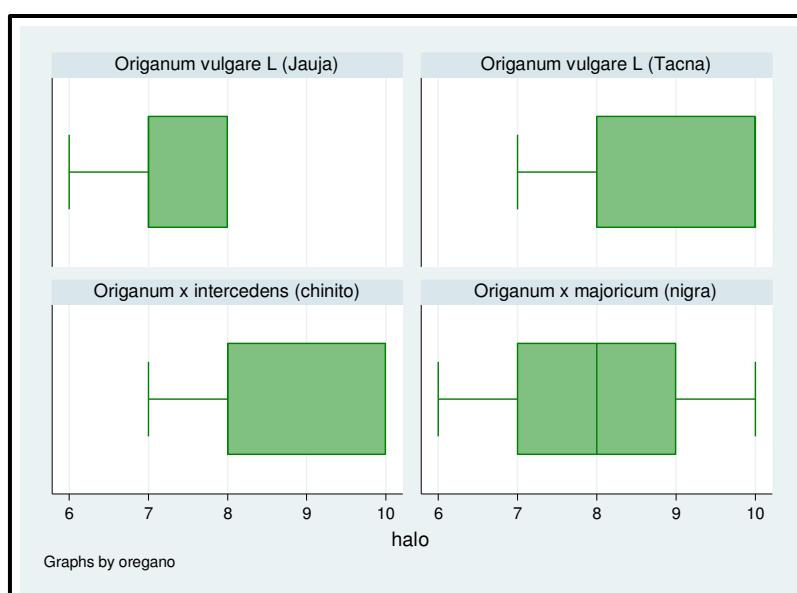
**Tabla 10. Medidas de tendencia central y dispersion del halo de inhibición(mm) de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 12.5%, sobre cepa aislada de *Candida albicans***

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja)	7	7.14	0.69	7	0.5	6 - 8	0.03*
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna)	7	9	1.29	10	1	7 -10	
<i>Origanum x intercedens</i> (chinito)	7	8.57	1.13	8	1	7 -10	
<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	7	8	1.29	8	1	6 -10	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 8.45$

En la tabla 10, y fig. 8 se muestra que existen diferencias entre los diversos aceites de oréganos para la concentración de 12.5% en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.03$ ,  $\chi^2 = 8.45$ ). Siendo *Origanum x vulgare* L (Tacna) de mayor efecto, *Origanum x intercedens* (chinito) *Origanum x majoricum* (nigra), de efectos similares, superiores al *Origanum x vulgare* L (Jauja).

**Figura 8. Comparación entre grupos de los diferentes aceites esenciales de oreganos, concentración de 12.5%, sobre cepa aislada de *Candida albicans*.**



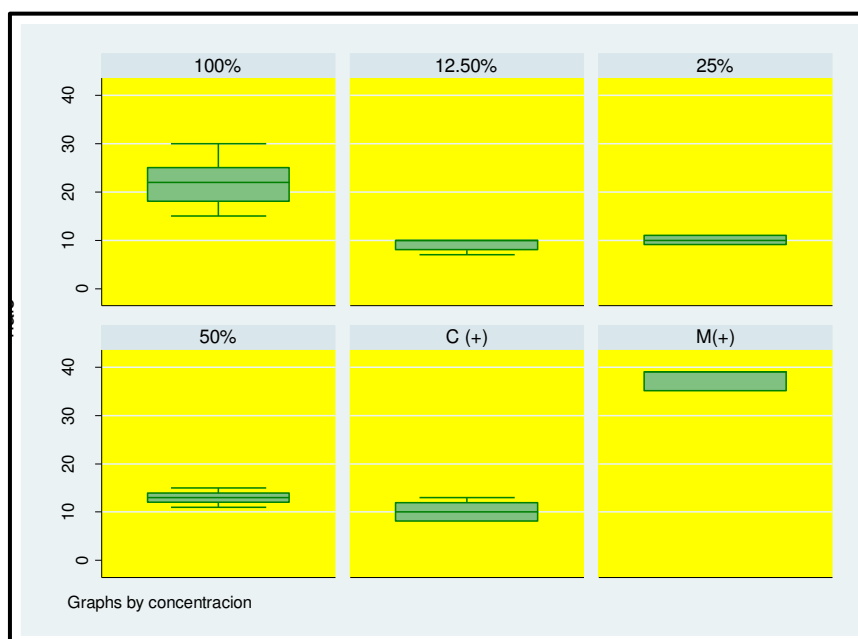
**Tabla 11. Comparación del halo de inhibición(mm) segun concentración de *Origanum x vulgare L (Tacna)* con Clorexidina y Miconazol**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	22.14	5.01	22	3.5	15 - 30	0.001*
50%	7	13	1.41	13	1	11-15	
25%	7	10.14	0.90	10	1	9-11	
12.5%	7	9	1.30	10	1	7- 10	
Clorhexidina	7	10	1.91	10	2	8-13	
Miconazol	7	37.29	2.14	39	2	35-39	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 23.31$

En la tabla 11, y fig. 9, se muestra que existen diferencias entre las diversas concentraciones del *Origanum x vulgare L (Tacna)* frente a Clorexidina y Miconazol en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 23.31$ ). Mostrando el Miconazol superior el efecto frente a las demas concentraciones y la Clorhexidina similar efecto a las concentraciones 25% y 12.5%.

**Figura 9. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x vulgare L (Tacna)* con Clorexidina y Miconazol**

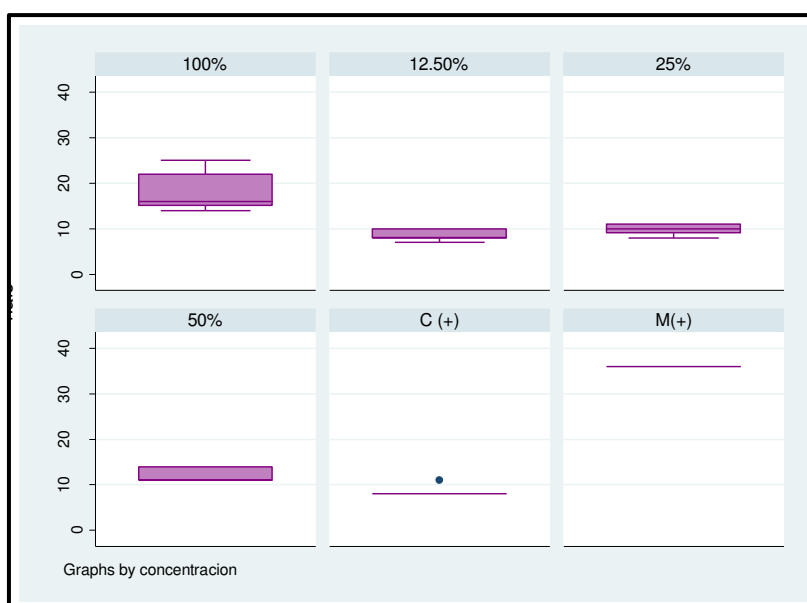


**Tabla 12. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x intercedens* (chinito) con Clorhexidina y Miconazol**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	18	4.04	16	3.5	14 - 25	0.001*
50%	7	12.14	1.47	11	1.5	11- 14	
25%	7	9.71	1.11	10	1	8 -11	
12.5%	7	8.57	1.13	8	1	7- 10	
Clorhexidina	7	8.43	1.13	8	0	8 -11	
Miconazol	7	36	0	36	0	36-36	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2=36.36$

**Figura 10. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x intercedens* (chinito) con Clorhexidina y Miconazol**



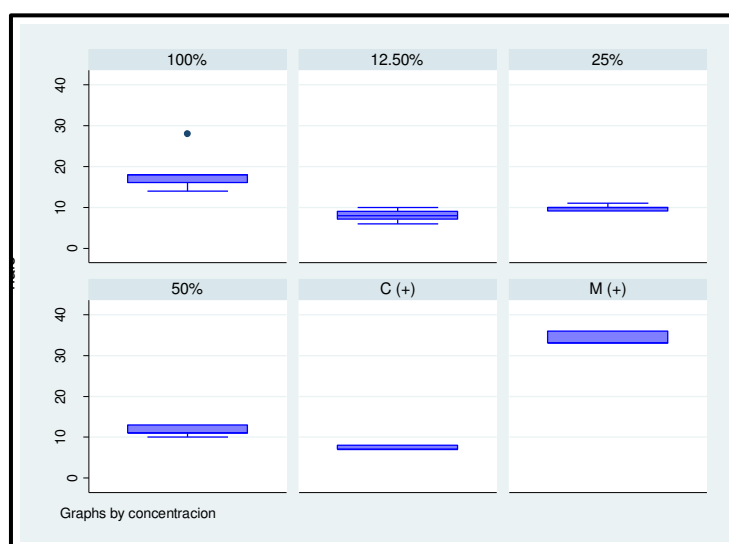
En la tabla 12, y fig. 10, se muestra que existen diferencias entre las diversas concentraciones del *Origanum x intercedens* (chinito) frente a Clorhexidina y Miconazol en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p=0.001$ ,  $\chi^2=36.36$ ). Mostrando el Miconazol superior el efecto frente a las demás concentraciones y la Clorhexidina similar efecto a la concentración 12.5%.

**Tabla 13. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x majoricum (Nigra)* con Clorhexidina y Miconazol**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	18.29	4.54	18	1	14 - 28	0.001*
50%	7	11.57	1.13	11	1	10 - 13	
25%	7	9.86	0.69	10	0.5	9 - 11	
12.5%	7	8	1.30	8	1	6 - 10	
Clorhexidina	7	7.43	0.53	7	0.5	7-8	
Miconazol	7	34.29	1.60	33	1.5	33-36	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis p <0.05 significativo chi2=38.15

**Figura 11. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x majoricum (Nigra)* con Clorhexidina y Miconazol**



En la tabla 13, y fig. 11 se muestra que existen diferencias entre las diversas concentraciones del *Origanum x majoricum (Nigra)* frente a Clorhexidina y Miconazol en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 36.36$ ). Mostrando el Miconazol un efecto superior frente a las demás concentraciones y la Clorhexidina menor efecto frente a las demás concentraciones.

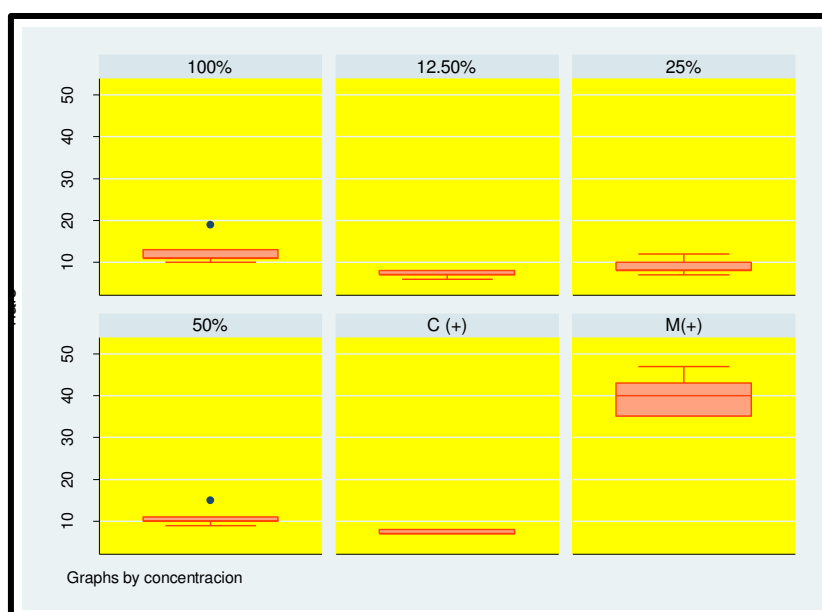
**Tabla 14. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x vulgare L (Jauja)* con Clorhexidina y Miconazol**

Concentración	n	Media	Desviación estándar	Mediana	DIC	Min-max	p
100%	7	12.43	3.05	11	1	10 - 19	0.0001*
50%	7	10.71	1.98	10	0.5	9-15	
25%	7	8.86	1.68	8	1	7-12	
12.5%	7	7.14	0.70	7	0.5	6- 8	
Clorhexidina	7	7.43	0.53	7	0.5	7-8	
Miconazol	7	40.14	4.26	40	4	35-47	

\*Prueba H de Kruskal-Wallis  $p < 0.05$  significativo  $\chi^2 = 38.15$

En la tabla 14, y fig. 12, se muestra que existen diferencias entre las diversas concentraciones del *Origanum x vulgare L (Jauja)* frente a Clorhexidina y Miconazol en cepa de *Candida albicans*, mediante la prueba H de Kruskal-Wallis, se comprueba que las diferencias son estadísticamente significativas  $p < 0.05$  ( $p = 0.001$ ,  $\chi^2 = 38.15$ ). Mostrando el Miconazol un efecto superior frente a las demás concentraciones y la Clorhexidina efecto similar a la concentración del 12.5%.

**Figura 12. Comparación del halo de inhibición(mm) según concentración de *Origanum x vulgare L (Jauja)* con Clorhexidina y Miconazol**



- La actividad antimicótica del aceite esencial del *Origanum vulgare L*, (Tacna) sobre *Candida albicans*, presenta Sensibilidad Límite a partir de 12,5% y Sumamente Sensible al 100% de concentración.
- La actividad antimicótica de aceite esencial del *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* (nigra) presentan Sensibilidad Límite a partir del 12,5% y Sensibilidad Media al 100% de concentración.
- La actividad antimicótica de aceite esencial del *Origanum vulgare L*, (Jauja) sobre *Candida albicans*, presenta Sensibilidad Límite del 50% al 100% de concentración.

**Tabla 15 Actividad antimicótica de los aceites esenciales estudiados frente a *Candida albicans* y control positivo (C+) Miconazol y Clorhexidina (Halos de inhibición expresada en mm).**

Concen- tración	<i>Origanum vulgare L</i> (Tacna)	<i>Origanum x interceden s</i> (chinito)	<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	<i>Origanum vulgare L</i> (Jauja)	Miconazol 20 mg /g (C+)	Clorhexidina 0.12% (C+)
100%	22,14 <sup>4</sup>	18,00 <sup>3</sup>	18,29 <sup>3</sup>	12,43 <sup>2</sup>	37,29 <sup>4</sup>	10,00 <sup>2</sup>
50%	13,00 <sup>2</sup>	12,14 <sup>2</sup>	11,57 <sup>2</sup>	10,71 <sup>2</sup>	36,00 <sup>4</sup>	8,43 <sup>2</sup>
25%	10,14 <sup>2</sup>	9,71 <sup>2</sup>	9,86 <sup>2</sup>	8,86 <sup>2</sup>	34,29 <sup>4</sup>	7,43 <sup>1</sup>
12.5%	9,00 <sup>2</sup>	8,57 <sup>2</sup>	8,00 <sup>1</sup>	7,14 <sup>1</sup>	40,14 <sup>4</sup>	7,43 <sup>1</sup>

**El súper índice en los resultados, indica el Valor de sensibilidad según el método de aromatograma de Duraffourd:(69)** (1) Sensibilidad nula:  $\leq 8$  mm; (2) Sensibilidad límite: 9 a 14 mm; (3) Sensibilidad media: 15 a 19 mm; (4) Sensibilidad sumamente sensible:  $\geq 20$  mm

## Composición química del aceite esencial de orégano

La composición química de los aceites esenciales de las especies de orégano estudiadas fue determinada por Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas (CG/EM), los resultados se muestran en las tablas y cromatograma. Tablas 7-10 y Figs. 6-9

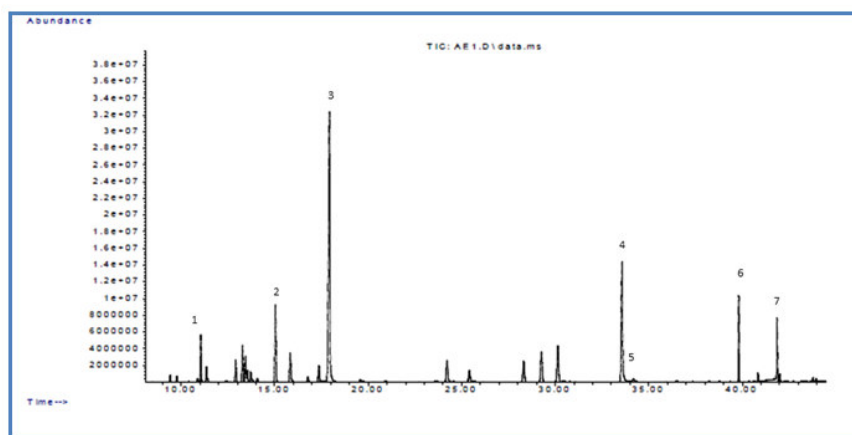
**Tabla 16. Composición química aceite esencial *Origanum x intercedens* (chinito) “AEACH1”**

N R O	Nombre del compuesto (NIST08.L)	“AEACH1”	
		tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	$\alpha$ -Tujeno	9,41	0,40
2	$\alpha$ -Pineno	9,77	0,35
3	1-Octen-3-ol	10,88	0,26
4	Sabineno	11,05	3,41
5	$\beta$ -Mirreno	11,35	1,08
6	$\beta$ -Pineno	11,42	0,17
7	$\alpha$ Terpineno	12,92	1,80
8	$\alpha$ -Cimeno	13,28	3,06
9	trans-Ocimeno	13,44	2,18
10	D-Limoneno	13,54	0,93
11	$\beta$ -felandreno	13,73	0,84
12	Eucaliptol	13,81	0,18
13	cis-Ocimeno	14,07	0,29
14	$\gamma$ -terpineno	15,04	7,13
15	(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-2-metil-5-(1-metiletil), biciclo [3.1.0] hexan-2-ol	15,83	2,95
16	$\alpha$ -Terpinoleno	16,78	0,49
17	Linalol	17,36	1,71
18	cis- $\beta$ -Terpineol	17,93	33,62
19	trans-1-metil-4-(1-metiletil) 2-Ciclohexen-1-ol	19,59	0,27
20	(1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ )-2-metil-5-(1-metiletil)	20,93	0,11
21	4-Terpineol	24,21	2,69
22	$\alpha$ -Terpineol	25,40	1,52
23	Timol metil éter	28,31	2,66
24	1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno	29,26	4,06
25	Acetato de linalol	30,15	4,65
26	3-careno	30,45	0,15
27	Timol	33,56	13,21
28	Carvacrol	34,18	0,36
29	$\beta$ -Cariofileno	39,81	4,46
30	$\alpha$ -Cariofileno	40,84	0,49
31	Elixeno	41,86	3,58
32	$\beta$ -Bisaboleno	42,01	0,42
33	Epatulenol	43,77	0,29
34	Oxido de cariofileno	43,94	0,24

En la tabla 16, se observa 34 compuestos químicos cuya cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto, mostradas en el Cromatograma de gases (Fig. 13)

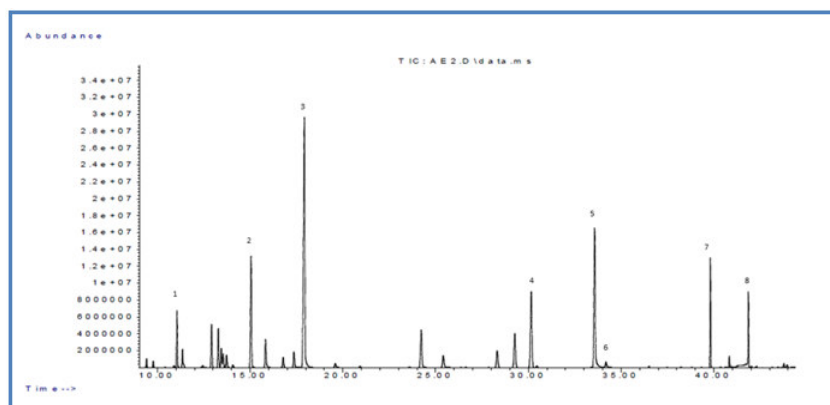


**Figura 13. Cromatograma de gases de aceite esencial *Origanum x intercedens* (chinito)(AEACH1).**



En la fig.13 se observa presencia de los compuestos con mayores porcentajes: (1) o-cimeno, (2)  $\gamma$ -terpineno, (3) cis-  $\beta$  -terpineol, (4), timol, (5) carvacrol, (6),  $\beta$  -cariofileno, (7) elixeno.

**Figura 14. Cromatograma de gases de aceite esencial *Origanum x majoricum* (nigra)(AEANE-2).**



En la fig.14 se observa presencia de los compuestos con mayores porcentajes: (1)  $\alpha$  terpineno, (2) o-cimeno, (3) cis-  $\beta$  -terpineol, (4) acetato de linalol (5), timol, (6) carvacrol, (7)  $\beta$  -cariofileno, (8)  $\gamma$ -elemeno.

**Tabla 17. Composición química aceite esencial *Origanum x majoricum*, (nigra) “AEANE-2”**

NRO.	Nombre del compuesto (NIST08.L)	“AEANE-2”	
		tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	$\alpha$ -Tujeno	9,41	0,48
2	$\alpha$ -Pineno	9,77	0,38
3	1-Octen-3-ol	10,89	0,12
4	Sabineno	11,06	3,53
5	$\beta$ -Mirceno	11,36	1,16
6	$\alpha$ -felandreno	12,45	0,14
7	$\alpha$ Terpineno	12,92	3,06
8	$\alpha$ -Cimeno	13,29	2,84
9	trans-Ocimeno	13,42	1,40
10	D-Limoneno	13,54	1,00
11	$\beta$ -felandreno	13,73	0,97
12	ocimeno	14,07	20,00
13	$\alpha$ terpineno	15,05	8,98
14	(1 $\alpha$ 2-metil-5-(1-metiletil),biciclo{3.1.0}hexan-2-ol	15,84	2,48
15	$\alpha$ -Terpinoleno	16,78	0,87
16	Linalol	17,36	1,41
17	cis- $\beta$ -Terpineol	17,92	26,31
18	trans-1-metil-4-(1-metiletil) 2-Ciclohexen-1-ol	19,59	0,40
19	1-metil-4-(1-metiletil)1,4-ciclohexadieno	20,92	0,16
20	4-Terpineol	24,23	4,09
21	$\alpha$ -Terpineol	25,41	1,43
22	Timol metil éter	28,32	1,89
23	1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno	29,27	3,94
24	Acetato de linalol	30,16	8,58
25	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno	30,46	0,16
26	Timol	33,57	13,39
27	Carvacrol	34,18	0,53
28	2.5.6-trimetil-136-heptatrieno	36,51	0,11
29	$\beta$ -Cariofileno	39,81	5,11
30	$\alpha$ -Cariofileno	40,84	0,53
31	$\gamma$ -elemeno	41,86	3,69
32	Elixeno	41,73	0,18
33	Espatuleno	43,78	0,26
34	Oxido de cariofileno	43,94	0,20

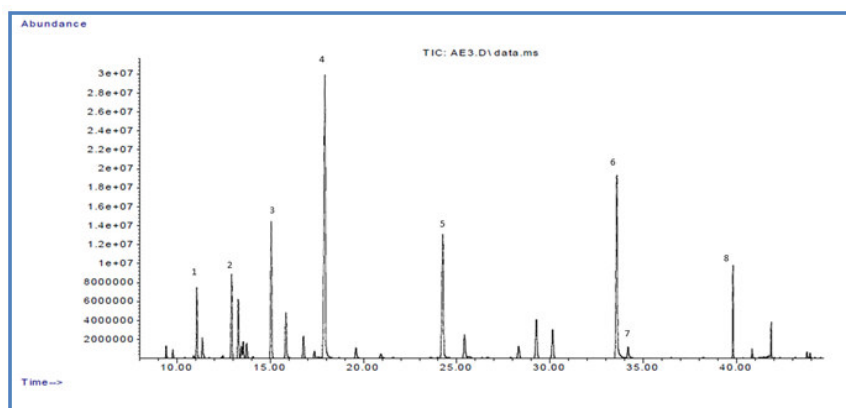
En la tabla 17, se observa 34 compuestos químicos cuya cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto, mostradas en el Cromatograma de gases (Fig. 14)

**Tabla 18. Composición química aceite esencial *Origanum vulgare* L (Tacna) “AETA-3”**

Nro	Nombre del compuesto (NIST08.L)	“AETA-3”	
		tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	$\alpha$ -Tujeno	9,41	0,54
2	$\alpha$ -Pino	9,78	0,40
3	1-Octen-3-ol	10,89	0,14
4	Sabineno	11,05	3,67
5	$\beta$ -Mirceno	11,36	1,09
6	$\beta$ -Pino	11,42	0,13
7	$\alpha$ -felandreno	12,45	0,16
8	$\alpha$ Terpineno	12,92	4,90
9	$\alpha$ -Cimeno	13,29	3,52
10	trans-Ocimeno	13,44	0,71
11	D-Limoneno	13,55	1,01
12	$\beta$ -felandreno	13,74	0,93
13	cis-Ocimeno	12,07	0,09
14	$\gamma$ -terpineno	15,05	9,04
15	(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-2-metil-5-(1-metiletil), biciclo [3.1.0] hexan-2-ol	15,84	3,30
16	$\alpha$ -Terpinoleno	16,78	1,54
17	Linalol	17,36	0,54
18	cis- $\beta$ -Terpineol	17,93	24,57
19	trans-1-metil-4-(1-metiletil) 2-Ciclohexen-1-ol	19,60	0,86
20	cis-1-metil-4-(1-metietil)-2-ciclohexen-1-ol	20,93	0,40
21	4-Terpineol	24,25	11,56
22	$\alpha$ -Terpineol	25,42	2,22
23	Timol metil éter	28,32	1,13
24	1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno	29,27	3,67
25	Acetato de linalol	30,14	2,59
26	Timol	33,58	14,71
27	Carvacrol	34,18	0,88
28	$\beta$ -Cariofileno	39,81	3,48
29	$\alpha$ -Cariofileno	40,84	0,36
30	$\gamma$ -elemeno	41,86	1,34
31	Espatuleno	43,78	0,27
32	Oxido de cariofileno	43,95	0,26

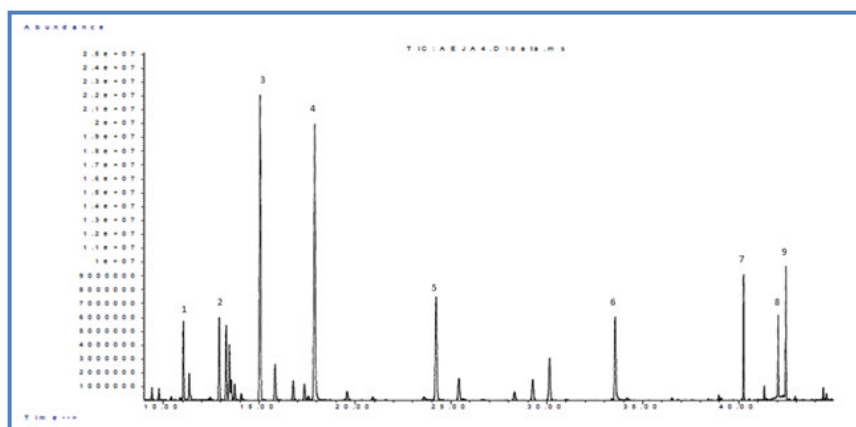
En la tabla 18, se observa 32 compuestos químicos cuya cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto, mostradas en el Cromatograma de gases (Fig. 15)

**Figura 15. Cromatograma de gases de aceite esencial *Origanum vulgare* L (Tacna) (AETA-3).**



En la fig.15, Se observa presencia de los compuestos con mayores porcentajes: (1)sabineno, (2)  $\alpha$  terpineno, (3)  $\gamma$ -terpineno, (4) cis-  $\beta$  –terpineol, (5) 4-terpineol, (6) timol, (7) carvacrol, (8)  $\beta$  –cariofileno.

**Figura 16. Cromatograma de gases de aceite esencial *Origanum vulgare* L (Jauja) (AEJA-4).**



En la fig.16, se observa presencia de los compuestos con mayores porcentajes: (1) sabineno, (2)  $\alpha$  terpineno, (3) cis-  $\beta$  –terpineol, (4)  $\gamma$ -terpineno, (5) 4-terpineol, (6) timol, (7)  $\beta$  –cariofileno, (8)  $\beta$ -cubebeno, (9)  $\gamma$ -elemeno. (carvacrol no figura).

**Tabla 19. Composición química aceite esencial *Origanum vulgare* L (Jauja) “AEJA-4”**

NRO.	Nombre del compuesto (NIST08.L)	“AEJA-4”	
		tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	$\alpha$ -Tujeno	9,41	0,52
2	$\alpha$ -Pino	9,77	0,48
3	Canfeno	10,41	0,15
4	Sabineno	11,05	3,68
5	$\beta$ -Mirreno	11,34	1,44
6	$\alpha$ Terpineno	12,91	4,34
7	p-Cimeno	13,28	4,00
8	trans-Ocimeno	13,44	2,94
9	D-Limoneno	13,54	1,03
10	$\beta$ -felandreno	13,73	0,89
11	cis-Ocimeno	14,06	0,37
12	$\gamma$ -terpineno	15,04	18,29
13	(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\alpha$ )-2-metil-5-(1-metiletil), biciclo [3.1.0] hexan-2-ol	15,82	2,31
14	$\alpha$ -Terpinoleno	16,77	1,21
15	Linalol	17,35	1,05
16	1-Octen-3-il-acetato	17,57	0,27
17	cis- $\beta$ -Terpineol	17,90	19,95
18	trans-1-metil-4-(1-metiletil) 2-Ciclohexen-1-ol	19,58	0,68
19	Desconocido(C10H18O)	20,92	0,28
20	4-Terpineol	24,22	8,31
21	$\alpha$ -Terpineol	25,41	1,86
22	Borneol	23,58	0,41
23	Timol metil éter	28,31	0,70
24	1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno	29,26	1,79
25	Acetato de linalol	30,14	3,49
26	Timol	33,56	5,86
27	p-Timol	34,18	0,17
28	$\beta$ -Bourboneno	38,96	0,19
29	$\beta$ -Cariofileno	40,25	4,48
30	$\alpha$ -Cariofileno	41,34	0,49
31	$\beta$ -Cubebeno	42,06	2,88
32	$\gamma$ -elemeno	42,46	4,73
33	Espatuleno	44,41	0,49
34	Oxido de cariofileno	44,47	0,31

En la tabla19, se observa 34 compuestos químicos cuya cuantificación se realizó mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto, mostradas en el Cromatograma de gases (Fig. 16)

**Tabla 20. Resumen comparativo: Composición química de AEO *Origanum x intercedens* (chinito) (AEACH1), *Origanum x majoricum* (nigra)(AEANE-2), *Origanum vulgare* L (Tacna) (AETA-3), *Origanum vulgare* L (Jauja) (AEJA-4).**

NRO.	Nombre del compuesto (NIST08.L)	"AEACH1"		"AEANE-2"		"AETA-3"		"AEJA-4"	
		tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)	tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)	tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)	tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	α-Tujeno	9,41	0,40	9,41	0,48	9,41	0,54	9,41	0,52
2	α-Pineno	9,77	0,35	9,77	0,38	9,78	0,40	9,77	0,48
3	Canfeno							10,41	0,15
4	1-Octen-3-ol	10,88	0,26	10,89	0,12	10,89	0,14		
5	Sabineno	11,05	3,41	11,06	3,53	11,05	3,67	11,05	3,68
6	β-Mirceno	11,35	1,08	11,36	1,16	11,36	1,09	11,34	1,44
7	β -Pineno	11,42	0,17			11,42	0,13		
8	α -felandreno			12,45	0,14	12,45	0,16		
9	α Terpineno	12,92	1,80	12,92	3,06	12,92	4,90	12,91	4,34
10	p-Cimeno							13,28	4,00
11	o-Cimeno	13,28	3,06	13,29	2,84	13,29	3,52		
12	trans-Ocimeno	13,44	2,18	13,42	1,40	13,44	0,71	13,44	2,94
13	D-Limoneno	13,54	0,93	13,54	1,00	13,55	1,01	13,54	1,03
14	β -felandreno	13,73	0,84	13,73	0,97	13,74	0,93	13,73	0,89
15	Eucaliptol	13,81	0,18						
16	ocimeno			14,07	20,00				
17	cis-Ocimeno	14,07	0,29			12,07	0,09	14,06	0,37
18	γ-terpineno	15,04	7,13			15,05	9,04	15,04	18,29
19	α terpineno			15,05	8,98				
20	(1 αβ2-metil-5-(1-metiletil),biciclo[3.1.0]hexan-2-ol			15,84	2,48				
21	(1 α,2 β,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil), biciclo [3.1.0] hexan-2-ol	15,83	2,95			15,84	3,30	15,82	2,31
22	α -Terpinoleno	16,78	0,49	16,78	0,87	16,78	1,54	16,77	1,21
23	Linalol	17,36	1,71	17,36	1,41	17,36	0,54	17,35	1,05
24	1-Octen-3-il-acetato							17,57	0,27
25	cis- β -Terpineol	17,93	33,62	17,92	26,31	17,93	24,57	17,90	19,95
26	trans-1-metil-4-(1-metiletil) 2-Ciclohexen-1-ol	19,59	0,27	19,59	0,40	19,60	0,86	19,58	0,68
27	1-metil-4-(1-metiletil)1,4-ciclohexadieno			20,92	0,16				
28	Desconocido(C10H18O)							20,92	0,28
29	(1 α,2 α ,5 α)-2-metil-5-(1-metiletil)	20,93	0,11						
30	cis-1-metil-4-(1-metietil)-2-ciclohexen-1-ol					20,93	0,40		
31	4-Terpineol	24,21	2,69	24,23	4,09	24,25	11,56	24,22	8,31
32	α-Terpineol	25,40	1,52	25,41	1,43	25,42	2,22	25,41	1,86
33	Borneol							23,58	0,41
34	Timol metil éter	28,31	2,66	28,32	1,89	28,32	1,13	28,31	0,70
35	1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno	29,26	4,06	29,27	3,94	29,27	3,67	29,26	1,79
36	Acetato de linalol	30,15	4,65	30,16	8,58	30,14	2,59	30,14	3,49
37	3-careno	30,45	0,15						
38	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno			30,46	0,16				
39	Timol	33,56	13,21	33,57	13,39	33,58	14,71	33,56	5,86
40	p-Timol							34,18	0,17
41	Carvacrol	34,18	0,36	34,18	0,53	34,18	0,88		
42	2.5.6-trimetil-136-heptatrieno			36,51	0,11				
43	β-Bourboneno							38,96	0,19
44	β -Cariofileno	39,81	4,46	39,81	5,11	39,81	3,48	40,25	4,48
45	α-Cariofileno	40,84	0,49	40,84	0,53	40,84	0,36	41,34	0,49
46	β -Cubebeno							42,06	2,88
47	γ-elemeno			41,86	3,69	41,86	1,34	42,46	4,73
48	Elixeno	41,86	3,58	41,73	0,18				
49	β -Bisaboleno	42,01	0,42						
50	Espatuleno	43,77	0,29	43,78	0,26	43,78	0,27	44,41	0,49
51	Oxido de cariofileno	43,94	0,24	43,94	0,20	43,95	0,26	44,47	0,31

En la tabla 20, se observar que el *Timol* se encuentra en promedio 13,7 % en las variedades *Origanum x intercedens* (chinito) (AEACH1), *Origanum x majoricum* (nigra)(AEANE-2),y *Origanum vulgare L* (Tacna) ) (AETA-3) , y 5,86 % en *Origanum vulgare L* (Jauja) (AEJA-4).; El *carvacrol* está contenido en bajo porcentaje en las tres primeras especies, no se encuentra en el *Origanum vulgare L* (Jauja) (AEJA-4).; el *p-Cimeno*, antagonista del timol y carvacrol, solo se encuentra en el *Origanum vulgare L* (Jauja) (AEJA-4).

**Tabla 21. Principales quimiotipos de Orégano.**

Nombre Científico	Principales componentes
<i>Origanum x intercedens</i>	o-cimeno, $\gamma$ -terpineno, cis- $\beta$ -terpineol, timol, carvacrol , $\beta$ –cariofileno y elixeno.
<i>Origanum x majoricum</i>	$\alpha$ terpineno, o-cimeno, cis- $\beta$ –terpineol, acetato de linalol, timol, carvacrol, $\beta$ –cariofileno, $\gamma$ -elemeno.
<i>Origanum vulgare L</i> (Tacna)	sabineno, $\alpha$ terpineno, $\gamma$ -terpineno, cis- $\beta$ -terpineol, 4-terpineol, timol, carvacrol, $\beta$ –cariofileno
<i>Origanum vulgare L</i> (Jauja)	sabineno, $\alpha$ terpineno, cis- $\beta$ –terpineol, $\gamma$ -terpineno, 4-terpineol, timol, $\beta$ –cariofileno, $\beta$ -cubebeno, $\gamma$ -elemeno. (carvacrol no figura).

En la tabla 21 se observa los compuestos químicos de los AEO, que se encuentran en mayor porcentaje.

## 5.2. Otros Resultados

### Rendimiento de aceite esencial por especie de orégano

Para el procedimiento de extracción del AEO, se utilizaron hojas y flores. Las muestras de orégano Jauja y Tacna fueron procesadas en estado fresco debido a la falta de condiciones adecuadas para su deshidratación en el lugar de origen, a diferencia de las recolectadas en Arequipa.

**Tabla 22. Rendimiento de aceite esencial de orégano**

PROCED ENCIA	Estado de la muestra recolectada	Hojas y flores (peso en Kg.)	RENDIMIENT O (total en mL)	RENDIMIENT O mL/ Kg.	VOLUME N / PESO (%)
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja).	Fresco	1,600 Kg	5,3 mL	3,31	0,33
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna).	Fresco	3,100 Kg	15 mL	4,83	0,48
<i>Origanum x intercedens</i> “chinito” (Arequipa)	Deshidratad o	1,955kg	30 mL	15,34	1,53
<i>Origanum x majoricum</i> “nigra” (Arequipa)	Deshidratad o	1,985 Kg	45 mL	22,67	2,27

El rendimiento promedio de AEO para muestras frescas fue 4,07 mL/Kg y para muestras deshidratadas 19,0 mL/Kg.



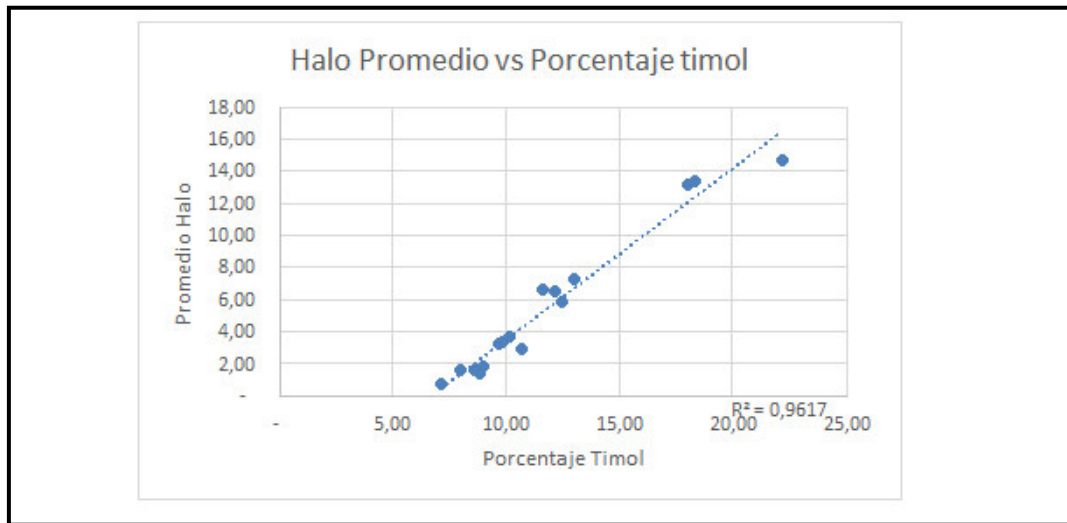
### Relación entre la acción inhibidora del timol / carvacrol

Se compara el halo y el porcentaje de timol / carvacrol a través de un diagrama de dispersión y se calcula el coeficiente de correlación lineal

**Tabla 23. Relación entre la acción inhibidora del timol / carvacrol**

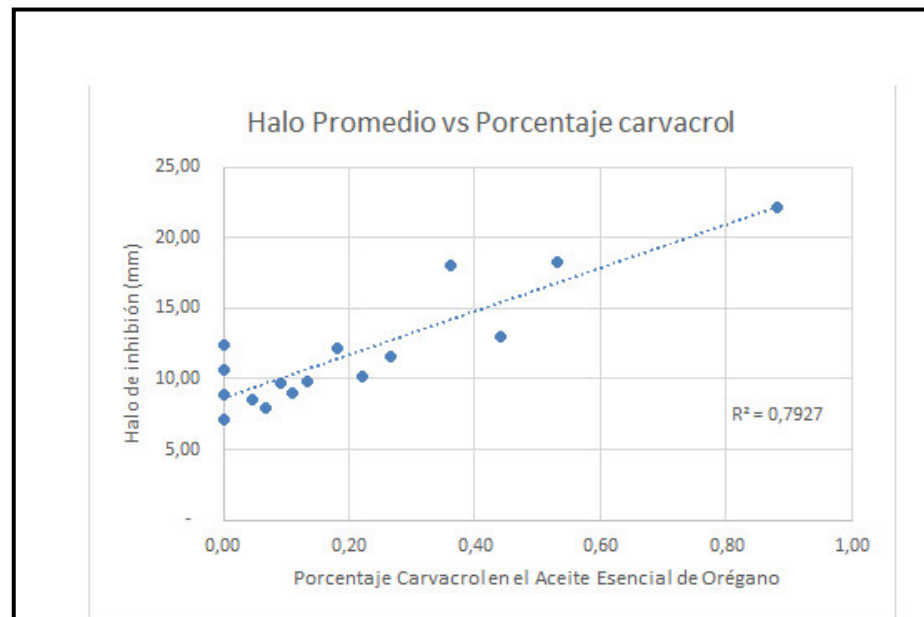
		Promedio halo	Porcentaje timol	Porcentaje carvacrol
<i>Origanum vulgare</i> L (Jauja)	100%	12.43	5.86	-
	50%	10.71	2.93	-
	25%	8.86	1.47	-
	12.5%	7.14	0.73	-
<i>Origanum vulgare</i> L (Tacna)	100%	22.14	14.71	0.88
	50%	13.00	7.36	0.44
	25%	10.14	3.68	0.22
	12.5%	9.00	1.84	0.11
<i>Origanum x intercedens</i> (chinito)	100%	18.00	13.21	0.36
	50%	12.14	6.61	0.18
	25%	9.71	3.30	0.09
	12.5%	8.57	1.65	0.05
<i>Origanum x majoricum</i> (nigra)	100%	18.29	13.39	0.53
	50%	11.57	6.70	0.27
	25%	9.86	3.35	0.13
	12.5%	8.00	1.67	0.07

**Figura 17. Diagrama de dispersión y coeficiente de determinación entre halo / timol**



De la nube de puntos, se observa una relación positiva entre el halo de inhibición y el porcentaje de timol en el aceite esencial. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) da un valor de 0.96 el cual indica que el 96% de la variación del halo es explicado por el porcentaje de timol.

**Figura 18. Diagrama de dispersión y coeficiente de determinación entre halo / carvacrol**



De la nube de puntos, se observa una relación positiva entre el halo y el porcentaje de carvacrol en el aceite esencial. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) da un valor de 0,79 el cual indica que el 79% de la variación del halo es explicado por el porcentaje de carvacrol.

## VI. DISCUSIÓN

En la presente investigación se determinó por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masa (GS/MS) la composición química de *Origanum vulgare L* (Tacna), *Origanum x majoricum* (nigra), *Origanum x intercedens* (chinito), *Origanum vulgare L* (Jauja). Se encontró alrededor de 33 compuestos en cada una. Los compuestos que mostraron mayor porcentaje son: cis- $\beta$ -Terpineol, (entre 19,95% y 33.72%), o-cimeno (entre 2,84% y 4,0%), 4-terpineol (entre 2.69% y 11,56%),  $\gamma$ -terpineno (entre 7,13% y 18.29%), timol (entre 5,86% y 14,71%). El carvacrol mostró bajo porcentaje (entre 0,36 % y 0,88%) y no se encontró en el *Origanum vulgare L* (Jauja). Contrariamente Arcila et al.<sup>28</sup>, encontraron 16 a 56 compuestos, dentro de ellos timol con 53,6 % y carvacrol con 56,6%.

Cleff et al.<sup>13</sup>, encontraron timol (8,42%) y carvacrol (9,42%). Zuzarte et al.<sup>15</sup> carvacrol 41.5%. Jnaid et al.<sup>31</sup>, timol (1.09 %) y carvacrol (3.90%); Suzuki et al.<sup>32</sup>, sólo carvacrol (15.7%); Sharifzadeh et al.<sup>34</sup> timol (25,10%). Estas variaciones explican las características del quimiotipo y geotipo de las plantas.

En *Origanum vulgare L* (Jauja), se encontró p-cimeno (4,0 %), considerado como antagonista del timol y carvacrol según Arcila et al.<sup>28</sup>. Este resultado corrobora su afirmación.

La Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) de AEO sobre *Candida albicans* dio como resultado MIC = 1,25  $\mu$ g/mL para *Origanum vulgare L* (Tacna) y *Origanum intercedens* (chinito) y MIC = 2,309  $\mu$ g/mL para *Origanum majoricum* (nigra) y *Origanum vulgare L* (Jauja). Mientras que Brandolt et al.<sup>35</sup>, determinaron la MIC de AEO en el rango de 0,031  $\mu$ g/mL a 8  $\mu$ g/mL. De Castro et al.<sup>33</sup>, determinó MIC de AEO = 39 ( $\mu$ g/mL). Tampieri et al.<sup>10</sup> encontraron para el AEO MIC = 50  $\mu$ g/mL y para el carvacrol 100  $\mu$ g/mL Sharifzadeh et al.<sup>34</sup>, encontraron la MIC = 300  $\mu$ g/mL. Estas variaciones se deben al quimiotipo y geotipo de las plantas de orégano.

El rendimiento de extracción de AEO de las especies *Origanum vulgare* L (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y el *Origanum x majoricum* (nigra)(Arequipa ) por el método de destilación con arrastre de vapor de agua dio como resultado entre 0,33% y 2,27% mientras que Arcila et al.<sup>28</sup> muestra un rendimiento de 1,8% a 5,6%.

De todas las especies evaluadas con respecto a el efecto antimicótico el *Origanum x vulgare* L (Tacna), resulto el de mejor efecto, y el de menor efecto *Origanum x vulgare* L (Jauja), importante para futuras investigaciones, ya que se evidencia que existen diferencias según el lugar de procedencia de las muestras de orégano.

## VII CONCLUSIONES

1. Los aceites esenciales de *Origanum vulgare L*, (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* (chinito) y el *Origanum x majoricum* (nigra) (Arequipa) poseen efecto antimicótico sobre las cepas de *Candida albicans* obtenido de pacientes con Estomatitis Sub Protésica.
2. El efecto antimicótico de aceite esencial del *Origanum vulgare L*, (Tacna) sobre *Candida albicans* presenta Sensibilidad Límite a partir del 12,5% a Sumamente Sensible al 100% de concentración.
3. El efecto antimicótico de aceite esencial del *Origanum x intercedens* (chinito) y *Origanum x majoricum* “nigra” (Arequipa) presentan Sensibilidad Límite a partir del 12,5% a Sensibilidad Media al 100%. de concentración.  
El efecto antimicótico de aceite esencial del *Origanum vulgare L*, (Jauja) sobre *Candida albicans* presenta Sensibilidad Límite del 50% al 100% de concentración.
4. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del *Origanum vulgare L*, (Tacna), *Origanum x intercedens* chinito y *Origanum x majoricum* nigra (Arequipa) para *Candida albicans* resultó 1,1542 µg/mL, (12,5%). La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) *Origanum vulgare L*, (Jauja) resultó 2,3085 µg/mL (25%).
5. En el estudio las cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica, resultaron sumamente sensibles al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y resistentes a Clorhexidina (colutorio 0,12%); existe diferencias significativas en la actividad antimicótica *in vitro* de los AEO en concentraciones 12,5%, 25%, 50 % y 100% frente al Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%).

6. Los principales quimiotipos de los diversos AEO en relación al geotipo, son: **Timol** tiene en 13,7 % promedio, en las variedades *Origanum x intercedens* (chinito), *Origanum x majoricum* (nigra) y *Origanum vulgare L* (Tacna) y 5,86% en *Origanum vulgare L* (Jauja). El **carvacrol** tiene 0, 59% promedio en las tres primeras especies, no se encuentra en el *Origanum vulgare L* (Jauja).

El **p-Cimeno** tiene 4,0% y solo esta presente en el *Origanum vulgare* (Jauja). Éste es antagonista del timol y carvacrol,

7. Se reafirma el resultado de otros estudios sobre la relación positiva de la acción antimicótica de los AEO y sus principios activos timol y carvacrol sobre la *Candida albicans*.
8. El rendimiento de extracción de AEO en las especies *Origanum vulgare L* (Jauja y Tacna), *Origanum x intercedens* “chinito” y el *Origanum x majoricum (nigra)*(Arequipa) fue entre 0,33% a 2,27%.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudio de otras especies Orégano y de otras procedencias, buscando la mejor concentración en relación a sus principios activos timol y carvacrol.
2. Realizar estudios de tipo longitudinal de los efectos y actividad antimicótica de los aceites esenciales del orégano y sus diversas especies, en diversos aparatos utilizados en el tratamiento por las diversas especialidades como Ortodoncia, Ortopedia.etc
3. Proponer la elaboración de un producto de uso odontológico utilizando el aceite esencial y/o los principios activos del orégano.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noguera GA, Fleitas AT. Frecuencia de estomatitis subprotésica en pacientes portadores de dentaduras totales. Rev Odontol de los Andes. 2005; 1: 20-8.
2. Instructivo de registro de descriptores y fuentes de información [Internet]. 22:31:37 UTC [citado 22 de marzo de 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/jcarangoq72/instructivo-descriptoresfuentes>
3. Expósito JE, Olazabal MG, Calabuch HR. Factores de riesgos de la estomatitis subprótesis en los pacientes del municipio de Taguasco. 2008-2009. Gaceta Médica Espirituana. 2010; 12(2):1-4.
4. Sanchez MA, Reyes DE, Arias R, Rondon EA. Estomatitis subprotésica en pacientes venezolanos portadores de prótesis removibles. MEDISAN. 2013; 17(11):8057-63.
5. Brevis P, Cancino MJ, Cantin LM. Estomatitis subprótesis: estudio clínico y microbiológico de Candida. Int J Odontostomat. 2008, 2(1):101-108.
6. Cherian B, Sunil S. Use of Amorolfine in Candida- Associated Denture Stomatitis. Oral Maxillofac Pathol J. 2010 Ener; 1 (1):16-9.
7. Rammohan S, Juvvadi S, Gandikota C, Challa P, Manne R, Mathur A. Adherence of Streptococcus mutans and Candida albicans to different bracket materials. J Pharm Bioallied Sci. 2012; 4(Suppl 2):212-6.
8. Vasconcelos C, Correia S, Carméli S, Do Socorro P, Helena MA. Streptococcus mutans in denture stomatitis patients under antifungal therapy. Rev Odonto Ciênc. 2010; 25(2): 120-125.
9. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from denture wearers by repetitive sequence-based PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Feb; 30(2):141-9.
10. Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathologia. 2005 Apr; 159 (3):339-45.

11. Da Silva C, Majewski M, Rovira J, González J, González L, Vinauskien R. Atividade Antimicrobiana da Tintura e Infusão de *Origanum Vulgare* (Orégano). Int J Food Sci Technol. 2009 Feb; 44(2):394-401.
12. Adams A, Kumar S, Clauson M, Sahi S. Anti-yeast activities of Origanum oil against human pathogenic yeasts. Adv Biosci Biotechnol. 2011; 2(2):103-7.
13. Cleff MB, Meinerz AR, Xavier M, Schuch LF, Meireles MCA, Rodrigues MRA, et al. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against Candida species. Braz J Microbiol. 2010; 41(1): 116-123.
14. Souza AB, Lima E de O, Guedes DN, Pereira F de O, Souza EL, Sousa FB de. Efficacy of Origanum essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. Braz J Pharm Sci. 2010 Sept; 46 (3):499-508.
15. Zuzarte M, Vale-Silva L, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Vaz S, Canhoto J, et al. Antifungal activity of phenolic-rich Lavandula multifida L. essential oil. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 31(7):1359-66.
16. Awuapara N. Determinación de la asociación entre el edentulismo y la calidad de vida en la población adulta del distrito de Celendín, provincia de Celendín, Departamento de Cajamarca en 2010. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2010.
17. Belaúnde Gómez MA. Relación Entre el Acceso a la Atención Dental y el Edentulismo en Pobladores de 18 A 65 Años de del Distrito de Cajabamba, Provincia de Cajabamba, Departamento de Cajamarca, durante el periodo Febrero – Mayo de 2011. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Lima-Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2011.
18. Gonzáles RM, Herrera B, Osorio M, Madrazo D. Principales lesiones bucales y factores de riesgo presentes en población mayor de 60 años. Rev Cuba Estomatol. 2010 Marz; 47(1):105-14.
19. Betancourt AI, Cobas ME, Apolinaire J, Ruiz N, González D. Lesiones de la mucosa bucal en pacientes del consultorio 96-6 De Santa Clara. Medident Electrón. 2004 Dic; 8(4):1.
20. Dw M. Demonstrating the need for oral health education in geriatric institutions. Probe Ott Ont. 1998 Dec; 33(2):66-71.

21. Ramage G, Coco B, Sherry L, Bagg J, Lappin DF. *In Vitro Candida albicans* Biofilm Induced Proteinase Activity and SAP8 Expression Correlates with In Vivo Denture Stomatitis Severity. *Mycopathologia*. 2012 ;174(1):11-9.
22. Gasparoto TH, Sipert CR, de Oliveira CE, Porto VC, Santos CF, Campanelli AP, et al. Salivary immunity in elderly individuals presented with Candida-related denture stomatitis. *Gerodontology*. 2012 Jun; 29(2):e331-339.
23. Perea S. [Azole resistance in *Candida albicans*]. *Rev Esp Quimioter*. 2000 Sep; 13(3):314-7.
24. Odds FC. [Antifungal agent resistance of yeasts of clinical significance]. *Rev Clínica Esp*. 1995 Oct; 195 Suppl 3:56-7.
25. DIGEMID [Internet]. [citado 10 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/Main.asp?Seccion=475>
26. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2001; 62(2):156-61.
27. Madan N, Datta K. Combination syndrome. *J Indian Prosthodont Soc*. 2006; 6(1):10.
28. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, González de Mejía E. [Oregano: properties, composition and biological activity]. *Arch Latinoam Nutr*. 2004 Mar; 54(1):100-11.
29. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol*. 2008 Nov; 54 (11):950-6.
30. Campos FC, De Souza IPR, Portela MB, De Araujo RM, Freitas LB, Castro GF. Use of Chlorhexidine Gel (0.2%) to Control Gingivitis and *Candida* Species Colonization in Human Immunodeficiency Virus-infected Children: A Pilot Study. *Pediatr Dent*. 2011;33(2):153-7.
31. Jnaid Y, Yacoub R, Al-Biski F. Antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum vulgare* essential oil. *Int Food Res J*. 2016; 23(4):1706-10.

32. Suzuki ÉY. Óleo essencial de *Origanum vulgare* Linnaeus: uma alternativa contra as principais bactérias causadoras de mau odor. [Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Brasil. Universidade Federal de Juiz de Fora; 2013.
33. De Castro RD, de Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Costa EM, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. BMC Complement Altern Med. 2015 Nov 24;15:417.
34. Sharifzadeh A, Shokri H. Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. Avicenna J Phytomedicine. 2016; 6(2):215-22.
35. Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt LR, Martinez AMB de, Mendes JF, et al. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the *in vitro* susceptibility of isolates. Braz J Microbio. 2017;48(1):145-150.
36. Barbieri D de SV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Braz J Microbiol. 2007 Dec; 38(4):624-31.
37. Cobos MLR, Martinez MP. Comportamiento de prótesis dentales removibles como factor causal de estomatitis sub-protésica: Reporte de un caso. Act Odontol Colomb. 2012 Dic;2 (2):105-11.
38. Velazco G, Ortiz R, Bustillos L, Gonzalez A, Solorzano E. Análisis estructural de un acondicionador de tejido utilizado para el tratamiento de la estomatitis subprotésica. Acta Microscopica. 2009; 18(3):232-36.
39. Rodríguez J, Miranda T, Morejón H, Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. Rev Cuba Estomatol. 2002; 39(2): 187-233
40. Carreira P V, Urrutia A, E Z. La estomatitis subprótesis en pacientes desdentados totales. Rev Cuba Estomatol. 2000 Dic;37(3):133-9.
41. Carmona MC, Pulido M, Bolivar K, Cortés Y. Presencia de *Candida* en pacientes con estomatitis subprotésica que acuden a la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena en el periodo transcurrido entre agosto 2006-junio 2007. Revista Internacional de Ciencias de la Salud. 2008; 5 (2):90 – 9.

42. Potran, M., Markovic, D., Puskar, S., Jevremovic, D., Lainovic, T., Blazic, L. Factors influencing the occurrence of denture stomatitis in complete dentures wearers. *HealthMED*, 2012; 6(8). 2828-33.
43. Rocha LM, Silveira-Gomes F, Pedrosa S, Esteves R, Marques SH. Relationship among local and functional factors in the development of denture stomatitis in denture wearers in northern Brazil *Rev Odontol UNESP*. 2014 Sep.-Oct.; 43(5): 314-318.
44. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987 May;14(3):217-27.
45. Dorey JL, Blasberg B, MacEntee MI, Conklin RJ. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent*. 1985 Feb.;53(2):210-3.
46. Lazarde J. Estomatitis Subprotésica. *Acta Odontológica Venez*. 2001 Dic. ; 39 (3):9-17.
47. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, Rompré P, Deslauriers N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95 (1):51-9.
48. Patton LL, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Aug; 92(2):170-9.
49. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent*. 2014; 42(2):99-106.
50. Prabha LJ. Bacterial Load in Denture Stomatitis. *J Pharm Sci Res*. 2015;7(7):453-4.
51. Van C, Steenkamp V. Host factors affecting oral candidiasis. *South Afr J Epidemiol Infect*. 2011;26(1):18-21.
52. Pathmashri VP, Abirami. A Review on Denture Stomatitis. *J Pharm Sci Res*. 2016;8(8):875–877.
53. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans* , *Candida albicans* , and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLOS Pathog*. 2013 Oct; 9(10):e1003616.

54. Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso Mdos S, Prata MC, Jorge AO, Junqueira JC. Streptococcus mutans Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of Candida albicans. PLoS One. 2016 Mar 2;11(3):e0150457.
55. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G. *In vitro* activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral Candida isolates from patients suffering from denture stomatitis. Mycopathologia. 2012 Jan;173(1):35-46.
56. Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa ACB, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Aug;76(4):419-24.
57. Muñoz LM. Plantas medicinales españolas: *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae)(orégano). 2002 [citado 8 de junio de 2017]; Disponible en: [http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/3936/27\\_MunozCente no.pdf](http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/3936/27_MunozCente no.pdf)
58. Toledo R. Evaluación del Rendimientos y Niveles de Nutrientes al Follaje del Orégano (*Origanum vulgare* L) Bajo Fertilización Orgánica en Casa Sombra [Internet] [Tesis]. Mexico: Universidad Autónoma Agraria «Antonio Narro» (División de Carreras Agronómicas); 2013.
59. Baranska M, Schulz H, Krüger H, Quilitzsch R. Chemotaxonomy of aromatic plants of the *genus Origanum* via vibrational spectroscopy. Anal Bioanal Chem. 2005 Feb;381(6):1241-7.
60. Lee SP, Buber MT, Yang Q, Cerne R, Cortés RY, Sprous DG, et al. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. Br J Pharmacol. 2008 Apr;153(8):1739-49.
61. Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Verma RK, Yadav AK, Singh HP. Chemical Diversity in Indian Oregano (*Origanum vulgare* L.). Chem Biodivers. 2010 Aug;7(8):2054-64.
62. Ayala L, Silvana N, Zocarrato I, Gómez S. Utilización del orégano vulgar (*Origanum vulgare*) como fitobiótico en conejos de ceba. (Spanish). Rev Cuba Cienc Agric. 2011 May;45(2):159-61.

63. Young JF, Stagsted J, Jensen SK, Karlsson AH, Henckel P. Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. *Poult Sci.* 2003 Aug;82(8):1343-51.
64. Chishti S, Kaloo ZA, Sultan P. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *J Pharmacogn Phytother.* 2013 Oct;5(10):170-7.
65. Lejonklev J, Løkke MM, Larsen MK, Mortensen G, Petersen MA, Weisbjerg MR. Transfer of terpenes from essential oils into cow milk. *J Dairy Sci.* 2013 Jul;96(7):4235-41.
66. Asensio CM, Nepote V, Grosso NR. Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. *J Food Sci.* 2012 Sep; 77(9):S294-301.
67. Karamanos AJ, Sotiropoulou DEK. Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) letswart) essential oil during two cultivation seasons. *Ind Crops Prod.* 2013;46:246-52.
68. Ragi J, Pappert A, Rao B, Havkin-Frenkel D, Milgraum S. Oregano extract ointment for wound healing: a randomized, double-blind, petrolatum-controlled study evaluating efficacy. *J Drugs Dermatol JDD.* 2011;10(10):1168-72.
69. Checker R, Sandur SK, Sharma D, Patwardhan RS, Jayakumar S, Kohli V, et al. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-AT. *PLOS ONE.* 2012;7(2):e31318.
70. Alphen LB, Burt SA, Veenendaal AKJ, Bleumink-Pluym NMC, Putten JPM van. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits *Campylobacter jejuni* Motility and Infection of Epithelial Cells. *PLOS ONE.* 2012;7(9):e45343.
71. Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Gonçalves V, Seabra Á, et al. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Colon Oral Por Candida En Pacientes Que Asisten Una Clínica Dent En Braga Port.* 2010;27(3):119-24.
72. Moreno-Marín F. Detección de *Candida* SPP en pacientes candidatos al uso de prótesis fijas provisionales. *Med Oral.* 2008; 10(1):8-11.

73. García-Oltra E, García-Ramiro S, Martínez Pastor JC, Tibau R, Bori G, Bosch J, et al. Infección por *Candida* spp. sobre prótesis articulares. *Prosthet Jt Infect*. 2011;24 (1):37-41.
74. Albado Plaus E, Saez Flores G, Grabiell Ataucusi S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Medica Hered*. 2001;12(1):16-9.
75. Molinos (Jauja) [Internet]. [citado 30 de octubre de 2016]. Disponible en:
76. Ministerio de Agricultura y Riego. El clima en el Perú [Internet]. [citado 30 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/53-sector-agrario/el-clima/368-el-clima-en-el-peru#>
77. Municipalidad Distrital de Ilabaya [Internet]. [citado 30 de octubre de 2016]. Disponible en: [http://www.munilabaya.gob.pe/web/ila\\_recursos.php](http://www.munilabaya.gob.pe/web/ila_recursos.php)
78. Ayqui Vica Silvia E. Comportamiento Agronómico de Orégano Negro, Mejorana, Zambito y Chinito en Arequipa. 2010;20.
79. García A, Vizoso Á, Ramos A, Piloto J. Estudio toxicogenético de un extracto fluido de *ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). *Rev Cuba Plantas Med*. 2000;5(3):78-83.



## IX ANEXOS

### 9.1 Diagrama de flujo

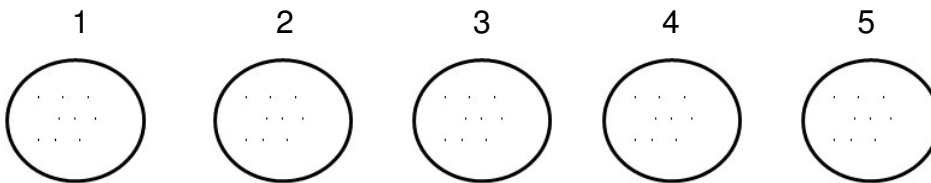
Efecto antimicótico *in vitro* del *Origanum vulgare* (orégano) en cepas de *CANDIDA ALBICANS* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica

#### Obtención de la muestra



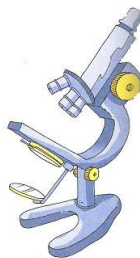
Muestra tomada con hisopo y transportada inmediatamente en SF al Laboratorio

#### Siembra de la muestra en Agar Sabouraud glucosado

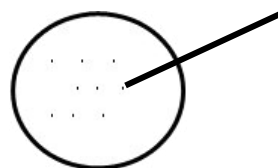


#### Observación macroscópica y microscópica

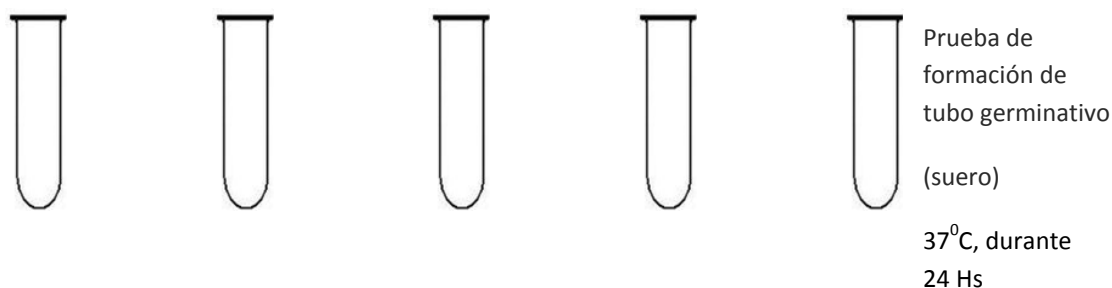
Observación macroscópica de colonias y microscópica (coloración de Gram)



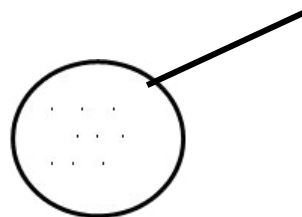
#### Obtención de cepa pura



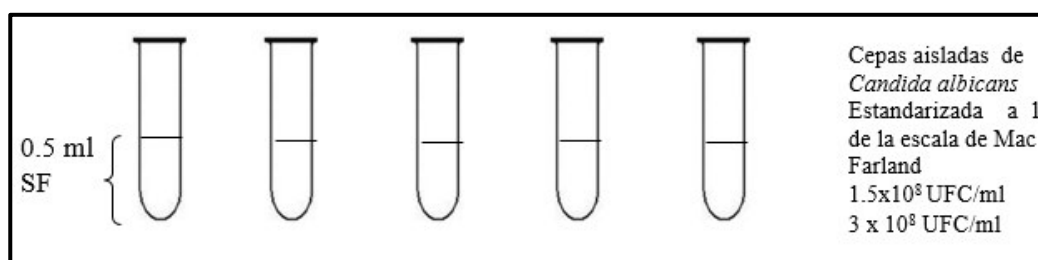
## Siembra para observar la formación de tubos germinativos



## Siembra en CHROMagar



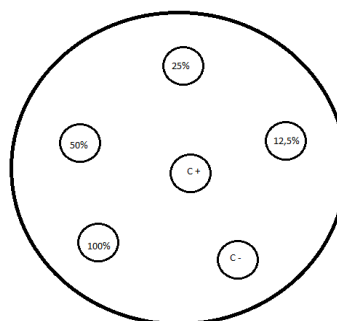
## Estandarización de la cepa



## Siembra por método de difusión por disco

**Nota:** Los discos de 6 mm de diámetro se impregnan por saturación con extracto *Origanum vulgare* y Miconazol. Se colocan en placas de Agar Sabouraud Glucosado (por duplicado)

## Lectura e interpretación



## 9.2 Instrumento de recolección de datos

Prueba <i>in vitro</i> para determinación de efecto antimicótico						
Aceite de orégano: _____						
Microorganismo: _____						
Halo de inhibición de crecimiento, medido en mm						
Diluciones	100 %	50 %	25 %	12,5 %	( + )*	( - )
Replica 1						
Replica 2						
Replica 3						
Replica 4						
Replica 5						
Replica 6						
Replica 7						
Replica 8						

\* Control (+) Miconazol (gel oral 20 mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%)

## 9.3 Constancias

### 9.3.1 Constancia 355-USM-2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"**

#### **CONSTANCIA N°. 355-USM-2012**

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Jorge Eleodoro VILLAVICENCIO GASTELÚ**, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Origanum vulgare L.***; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: LAMIALES**

**FAMILIA: LAMIACEAE**

**GENERO: *Origanum***

**ESPECIE: *Origanum vulgare L.***

Nombre vulgar: "Orégano".

Determinado por: Dra. Haydeé Montoya (José Campos).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 12 de noviembre de 2012



**Dra. MAGDA CHANCO ESTELA**  
JEFA (e) DEL HERBARIO DE SAN MARCOS (USM)

### 9.3.2 Constancia 176 USM-2013



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"**

#### **CONSTANCIA N° 176-USM-2013**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Jorge Eleodoro VILLAVICENCIO GASTELÚ** de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Origanum vulgare* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: LAMIALES**

**FAMILIA: LAMIACEAE**

**GENERO: *Origanum***

**ESPECIE: *Origanum vulgare* L.**

Nombre vulgar: "Orégano".

Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 01 de julio de 2013



## 9.4 Fotografías



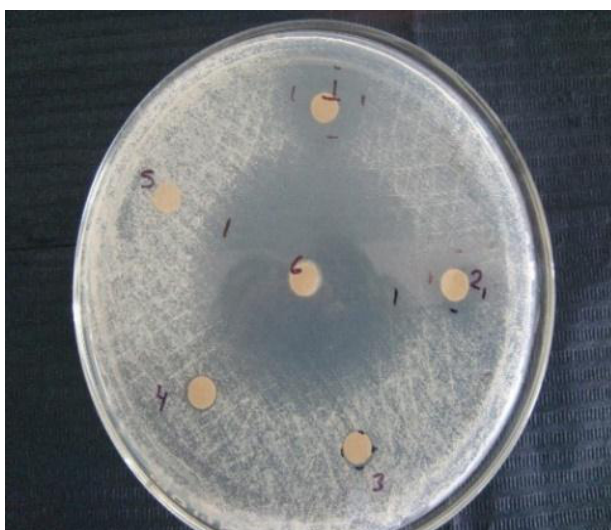
**Fotografía 1.** Planta de Orégano



**Fotografía 2.** Obtención de Aceite esencial de Orégano. Destilación por arrastre con vapor



**Fotografía 2.** Aceite Esencial de Orégano



**Fotografía. 3** Actividad antimicótica del AEO frente a *Candida albicans* Halos de inhibición de crecimiento en Medio Agar Sabouraud